

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

**LA VACCINATION DES NOUVEAU-NÉS PAR LE BCG
D'APRÈS LES DOCUMENTS
DE LA COMMISSION UKRAINIENNE**

par le Dr IAKHNIS (Kharkoff).

Dans ce travail, qui a pour but de présenter les résultats de nos observations de trois années sur la vaccination des nouveau-nés par le BCG d'après la méthode de Calmette, nous nous voyons obligé d'insister encore une fois, et en détail, sur la question de l'innocuité pratique de la souche BCG en ce qui concerne son application aux enfants. Les diversités d'avis et les discussions interminables rapportées dans la littérature médicale, ainsi que le refus opposé par quelques représentants éminents de la pensée pédiatrique de l'école viennoise d'encourager la vaccination des enfants, nous en font un devoir.

Nous voudrions jeter quelque lumière sur trois groupes de questions :

- 1^o Sur l'organisation pratique de la vaccination préventive des nouveau-nés par le BCG ;
- 2^o Sur l'innocuité de la souche BCG administrée *per os* aux enfants ;
- 3^o Sur les effets immunisants de la vaccination par le BCG.

I. — SUR L'ORGANISATION PRATIQUE DE LA VACCINATION PRÉVENTIVE DES NOUVEAU-NÉS PAR LE BCG.

La vaccination des nouveau-nés dans l'Ukraine est surtout mise en pratique à Kharkoff, à Artiomivsk, et à Dniepropetrovsk; beaucoup moins dans d'autres villes (Lougansk, Marioupol).

Quoiqu'elle soit appliquée à Kharkoff depuis trois ans déjà, et depuis deux ans dans les autres villes, le total de nos enfants vaccinés reste très restreint et ne s'élevait, jusqu'au 1^{er} août 1928, qu'à 818 enfants.

Il y a à cela toute une série de causes :

1^o D'après la résolution de la dixième conférence des bactériologistes de l'Union des Républiques à Odessa, en 1926, nous vaccinons presque exclusivement les enfants des familles tuberculeuses (formes ouvertes et actives de TBC).

2^o La raison pour laquelle nos chiffres sont relativement peu importants est que nous nous bornons à faire une expérience qui exige l'observation minutieuse des enfants vaccinés en ce qui concerne les conditions sociales et hygiéniques de leur vie, la stricte connaissance du caractère et de la forme de la maladie du membre de la famille atteint, la tuberculisation, etc... Il est évident que, pour suivre ainsi tous les enfants vaccinés, il faut que leur nombre ne soit pas trop grand.

Si l'organisation était parfaite, toutes les femmes enceintes des familles tuberculeuses devraient nous être connues. C'est ce à quoi nous nous sommes efforcés au début en nous mettant en contact direct avec les sœurs visiteuses des dispensaires, afin que toutes les femmes enceintes soient placées sous notre observation. Mais cette méthode, qui nous procura un grand nombre d'enfants vaccinés dans les familles tuberculeuses, ne manque pas de défauts. Pour tirer des conclusions définitives, il nous fallait une quantité suffisante d'enfants témoins *non vaccinés*, vivant en même temps et autant que possible dans les mêmes conditions sociales et économiques, surtout quant au contact tuberculeux. Ceci peut être réalisé par plusieurs moyens. On peut recueillir d'abord les renseignements sur toutes les femmes

enceintes des familles tuberculeuses en se proposant de vacciner seulement la moitié de ces enfants, laissant l'autre moitié comme témoins. Quoique cette manière de faire paraisse excellente et capable de fournir des indications très objectives, nous ne l'avons pas adoptée pour des raisons psychologiques surtout. Il est impossible de traiter les enfants comme les animaux de laboratoire. C'est pourquoi nous effectuons la vaccination, du moins à Kharkoff, d'après une autre méthode. Une partie des femmes enceintes de familles tuberculeuses échappe à la vaccination pour différentes causes (naissance à domicile ou dans les asiles où l'on ne vaccine pas, refus des mères, etc...). De sorte que nous disposons d'un groupe d'enfants témoins assez considérable (*non vaccinés*), qui nous est indispensable pour toute une série de comparaisons.

Nous ne prétendons pas que ce système de travail et d'organisation du contrôle soit le meilleur; il est possible que nous trouvions moyen de le rendre plus parfait. Nous avons surtout voulu éviter que tous les enfants de la même catégorie soient vaccinés dans la même période de temps, ce qui rend impossible tout examen comparatif de la vaccination.

D'après le plan tracé, tous les enfants *vaccinés* sont suivis par les consultations et les services d'enfants des dispensaires, en même temps que les *non vaccinés*. Nous avons, en outre, à Kharkoff un certain nombre de médecins et de visiteuses spéciales qui surveillent constamment un groupe d'enfants vaccinés et témoins. Si ces enfants, pour quelque cause, ne fréquentent pas les consultations, ils sont visités de temps à autre par nos médecins, et systématiquement par les sœurs-visiteuses. Tous les enfants qui donnent lieu à quelque soupçon sont dirigés sur l'Institut pour les tuberculeux (service d'enfants) pour leur examen clinique complémentaire.

De cette façon nous nous efforçons de suivre aussi parfaitement qu'il est possible les enfants vaccinés et les témoins non vaccinés des familles bacillifères qui nous paraissent vraiment intéressants.

Le vaccin est préparé par la section de tuberculose du premier Institut Sanitaire Bactériologique de l'Ukraine (Kharkoff, professeur agrégé M. Tzekhnovitzer) et, tous les dix jours, les maisons d'accouchement de Kharkoff en sont approvisionnées des

quantités nécessaires. Dans les autres villes, on l'envoie sur demande télégraphique par exprès postal.

Comme il a été déjà dit, depuis le 15 septembre 1925 jusqu'au 1^{er} août 1928, 818 nouveau-nés ont été vaccinés, dont 680 à Kharkoff. 72 de ces nouveau-nés ont été perdus de vue; 51 sont décédés; 695 sont vivants et minutieusement observés. La dernière catégorie d'enfants se subdivise, d'après l'âge et le contact tuberculeux, ainsi qu'il suit :

TABLEAU I.

ÂGES	PAS de contact	CONTACT avec TBC actif et présumé actif	CONTACT avec formes ouvertes de TBC	TOTAL
2-3 ans . . .	176	92	22	290
1-2 ans . . .	24	125	53	202
0-1 an . . .	52	108	43	203
Total . . .	252	325	118	695

Nous attirons l'attention sur le groupe assez considérable d'enfants (252) qui ont vécu et se sont développés hors de tout contact tuberculeux familial. La plus grande partie de ces enfants est actuellement (fin 1928) âgée de trois ans; elle a été vaccinée en septembre et octobre 1925, alors qu'une vaccination générale fut effectuée à Kharkoff dans trois maisons d'accouchement, sans tenir compte de la présence ou de l'absence du contact tuberculeux familial. Ce tableau nous montre que des enfants de la même catégorie se rencontrent aussi dans les groupes d'autres âges, bien que, dans la suite, on ne vaccinât plus que les enfants des familles tuberculeuses. Cela s'explique parce que plusieurs de ces enfants de familles sans contact tuberculeux ont été vaccinés, soit parce que leurs parents y consentaient, soit parce qu'il existait dans la famille quelque malade suspect, reconnu dans la suite non tuberculeux.

En tout cas, nous avons sous notre surveillance un assez grand nombre d'enfants sur lesquels, comme dans une expérience de laboratoire, nous pouvons étudier l'influence du vaccin, étant sûrs qu'il ne surviendrait ultérieurement, au moins pendant les premiers mois de leur vie, aucune cause de contamination virulente.

Le groupe suivant, le plus nombreux, comprend 325 enfants. Son trait caractéristique, au point de vue du contact familial est que l'enfant vit avec des malades atteints d'une tuberculose active fermée (« V » d'après la classification de la deuxième conférence). A ce groupe appartiennent aussi partiellement les malades présumés tuberculeux, dont le diagnostic n'a pas pu être défini vers le moment de l'inscription.

Le troisième groupe est constitué par les enfants des familles bacillifères. On comprend que ce groupe est particulièrement important pour nos comparaisons et nos déductions. Il n'est pas nombreux, ce qui s'explique par l'interruption assez fréquente de la grossesse, dictée par des considérations d'un caractère médical et social; cependant ce nombre nous semble assez grand pour que nous puissions en tirer toute une série de conclusions et de comparaisons.

Nous attirons l'attention (tableau I) sur le fait que la vaccination est pratiquée ces dernières années régulièrement, embrassant chaque mois un nombre à peu près égal de nouveaux enfants. Cette circonstance est très importante pour nos comparaisons de la mortalité générale des enfants vaccinés et non vaccinés. Nous y reviendrons encore dans la suite en détail.

Telle est, brièvement exposée, notre organisation de la vaccination des nouveau-nés par le BCG.

II. — L'INNOCUITÉ DE LA SOUCHE BCG ADMINISTRÉE PER OS POUR LA VACCINATION DES NOUVEAU-NÉS.

L'innocuité de la souche BCG nous semble être suffisamment démontrée et établie par les nombreux travaux des auteurs de tous les pays, ainsi que par les nôtres. Lorsqu'on étudie l'énorme masse de documents relatifs à l'étude expérimentale des qualités biologiques du BCG, on constate objectivement, malgré quelques diversités d'avis, que le fait le plus généralement admis est la perte durable du caractère pathogène (virus fixe d'après la conception de Pasteur).

Naturellement, c'est aux bactériologistes qu'il convient d'abandonner la poursuite des recherches expérimentales à ce sujet, sous la réserve qu'elles seront effectuées dans des établissements

sements scientifiques et par des savants hautement qualifiés et responsables.

Nous nous efforcerons de dégager de notre travail ce qu'une observation clinique minutieuse des enfants vaccinés a pu révéler concernant cette question.

A. AUTOPSIE DES ENFANTS VACCINÉS. — Dès le début de nos expériences nous nous sommes préoccupés d'avoir une certaine quantité d'autopsies d'enfants vaccinés et décédés de diverses maladies intercurrentes, mais nous n'avons pas tardé à nous convaincre qu'il est très difficile d'y parvenir. Le plus souvent, les enfants qui succombent aux maladies du jeune âge meurent dans leurs familles. Nous avons donc cherché à tourner cette difficulté en nous adressant aux enfants trouvés, recueillis dès les premiers jours de leur vie dans une des maisons pour nourrissons. Plusieurs années de pratique nous avaient démontré que, dans cette maison, toujours comble, manquant de lait de femme, les tout petits enfants ne survivent qu'exceptionnellement.

Durant ces deux dernières années 50 enfants y furent vaccinés par le BCG à différents moments. Ils succombaient tous habituellement vers les âges de sept jours à six mois, avec des désordres de nutrition. Pas une seule fois les autopsies effectuées ne révélèrent dans le système lymphatique et les organes parenchymateux la moindre lésion qu'on eût pu attribuer à des propriétés pathogènes du BCG. En même temps on effectuait l'analyse microscopique de ces organes.

D'après Calmette, on peut découvrir dans le système lymphatique, la rate et la moelle des os des enfants vaccinés, des bacilles acido-résistants et des cellules géantes qui contribuent à l'établissement de l'immunité produite par le BCG. Jusqu'ici nous n'avons pas trouvé de bacilles acido-résistants ni de lésions microscopiques nettes traduisant une réaction spécifique des tissus. Nous nous rendons bien compte de la difficulté extrême de ces trouvailles microscopiques dans des organes qui ne présentent pas de lésions macroscopiques. Aussi nous n'avons garde de nous prononcer sur leur existence ou leur absence, et nous continuerons à les rechercher dans la suite.

On peut discuter la question de savoir si cette absence de lésions microscopiques constitue un défaut de la vaccination

per os; peut-être, dans certains cas, les intestins éliminent-ils une trop grande quantité de bacilles, de sorte qu'il n'en reste pas suffisamment dans l'organisme. Les travaux à venir nous fixeront à ce sujet.

De toutes les constatations faites dans nos autopsies, il résulte qu'incontestablement les bacilles BCG introduits *per os*, même dans l'organisme des enfants les plus débiles privés de toute résistance, ne déterminent pas de lésions anatomo-pathologiques ni microscopiques pendant nos périodes d'observation. Ils ne manifestent *in vivo* aucun accroissement de leur virulence.

B. CROISSANCE DES ENFANTS VACCINÉS. — Si le BCG ne détermine pas de lésions, se peut-il que sa présence dans l'organisme de l'enfant exerce une influence nuisible sur sa croissance et sur sa résistance aux agents nuisibles endogènes et exogènes ?

Nous trouverons la réponse à cette question dans l'étude clinique scrupuleuse de la croissance des enfants vaccinés. Nous divisons nos enfants selon leur développement en groupes suivants :

- a) Croissance satisfaisante;
- b) Croissance au-dessous de la normale;
- c) Dystrophiques apparents;
- d) Et enfin différentes formes d'affections tuberculeuses.

Les autres cas pathologiques, d'ailleurs exceptionnels, ne sont pas inscrits dans des groupes à part, de sorte que la répartition de tous les enfants, d'après leur croissance et leur morbidité, se présente comme suit (tableau II) :

TABLEAU II. — Croissance des enfants vaccinés (tableau général).

ÂGE	CROISSANCE satisfaisante		CROISSANCE un peu au-dessous de la normale		DYSTROPHIQUES		ADÉNO-PATHIE trachéo-bronchique tuberculeuse		AUTRES FORMES de TBC		TOTAL
		p. 100		p. 100		p. 100		p. 100		p. 100	
2-3 ans . .	260	90	19	6,5	2	0,7	9	2,8			290
1-2 ans . .	175	86,6	16	8	2	1	8	4	1	0,5	202
0-1 an . .	193	95	7	3,4			3	1,6			203
Total .	628	90,4	42	6	4	0,6	20	2,85	1	0,45	695

Nous voyons que la grande majorité des enfants (90,4 p. 100) s'est développée tout à fait normalement.

Comme dans notre précédent rapport, faisons la réserve que, parmi ces enfants qui se développent normalement, il y a un certain pourcentage de sujets dont la peau est pâle et le tonus musculaire peu développé. Ce ne sont pas des eutrophiques, mais des enfants moyens, comme la plupart de ceux appartenant aux classes sociales de la population qui fréquente nos consultations.

Pour préciser plus exactement dans quel milieu social nous avons à travailler, nous avons dressé le tableau suivant qui tient compte des conditions domiciliaires et matérielles de la vie des enfants vaccinés et des soins qui leur sont donnés.

TABLEAU III.

<i>Habitation et conditions matérielles.</i>	<i>Soins.</i>
Tout à fait satisfaisantes	18 p. 100
Satisfaisantes	46 —
Mauvaises	36 —
Très satisfaisants	25 p. 100
Satisfaisants	60 —
Mauvais	45 —

Le pourcentage des enfants retardés dans leur croissance (9,6 p. 100) ne dépasse pas les normales moyennes fixées par nos consultations de nourrissons et basées sur l'expérience de plusieurs années.

Pour mieux définir ce que sont les enfants « retardés dans leur croissance », il n'est pas sans intérêt de lire le tableau IV, dans lequel les familles sont classées en groupes d'après les différentes natures de contact tuberculeux.

Eu égard à la question étudiée actuellement, le groupe « A » nous intéresse certainement le plus, car il met en relief l'influence du vaccin BCG sans complication possible d'une contamination virulente du dehors. Laissant de côté les cas isolés (1,1 p. 100) d'adénopathie trachéo-bronchique, nous comptons 18 enfants dont le développement est inférieur à la normale, soit 7,1 p. 100. Il faut prendre en considération que nous rapportons à ce groupe les enfants qui persistent longtemps à fournir des réactions tuberculiniques négatives; aussi devons-nous rejeter la supposition que leur développement peu satisfaisant est une manifestation de l'infection bacillaire. D'autant plus que le nombre de ces enfants est très faible et qu'en tout

cas leur pourcentage ne dépasse pas les chiffres moyens fixés par les consultations pour le groupe social. Les deux cas isolés de dystrophie manifeste se rapportent à deux enfants dont l'un est sujet à des troubles digestifs prolongés et l'autre un hérédosyphilitique.

TABLEAU IV. — Croissance des enfants vaccinés en relation avec la nature du contact tuberculeux.

ÂGE	CROISSANCE satisfaisante		CROISSANCE un peu au-dessous de la normale		DYSTROPHIQUES		ADÉNOPATHIE trachéo-bronchique tuberculeuse		AUTRES FORMES de TBC		TOTAL
		p. 100		p. 100		p. 100		p. 100		p. 100	
<i>A. — Absence de contact.</i>											
2-3 ans. .	161	91,4	12	6,8	1	0,6	2	1,1			176
1-2 ans. .	21	87,5	2	8,3	1	4,2					24
0-1 an .	50	96	2	4							52
Total .	232	92	16	6,3	2	0,8	2	0,8			232
<i>B. — Formes actives de tuberculose et présumées tuberculeuses.</i>											
2-3 ans. .	82	89,1	6	6,5	1	1,1	3	3,2			92
1-2 ans. .	10 ^a	87,2	12	9,6	1	0,8	3	2,4			12 ^a
0-1 an .	103	95,4	5	4,6							108
Total .	294	90,4	23	7,4	2	0,6	1	1,8			323
<i>C. — Formes ouvertes de TBC.</i>											
2-3 ans. .	17	77,3	4	4,5			4	18,2			22
1-2 ans. .	45	85	2	3,8			5	9,4	1	1	53
0-1 an .	40	93					3	7			43
Total .	102	86,5	3	2,6			12	10	4	4	118

Dans les familles dont un membre est tuberculeux actif, ou qui comptent des malades présumés tuberculeux, les pourcentages sont presque les mêmes. Il n'y a que le pourcentage des adénopathies trachéo-bronchiques qui augmente un peu.

Laissant pour le moment de côté le groupe « C » avec contact bacillifère, dont l'analyse détaillée sera donnée plus loin, nous tirons cette conclusion des faits précédents que : *la très grande majorité des enfants vaccinés se développent tout à fait normalement.*

**III. — COMPORTEMENT DES ENFANTS VACCINÉS
VIS-A-VIS DES AGENTS NUISIBLES ENDO ET EXOGÈNES.**

Cette croissance, très généralement normale, n'est nullement contrariée par les conditions d'habitat et d'existence très peu favorables, ni par un assez fort pourcentage de maladies aiguës diverses qu'ils subissent.

TABLEAU V. — Infections aiguës chez les enfants vaccinés.

Grippe	60 p 100
Rougeole	15 —
Coqueluche	10 —
Scarlatine	4 —

Dans la colonne grippe nous n'avons compté que les formes graves, accompagnées d'une température élevée et de foyers broncho-pneumoniques. Nous n'avons pas retenu les formes légères. Plusieurs d'entre ces enfants ont supporté deux et même trois maladies aiguës (rougeole-coqueluche ; rougeole-coqueluche-scarlatine). Ces infections, en règle générale, n'ont provoqué aucune complication, n'ont pas troublé le cours normal de la croissance des enfants.

Nous devons dire ce que nous avons constaté à propos des réactions tuberculiniques (cuti de Pirquet et surtout intradermo de Mantoux) chez les enfants vaccinés.

Calmette hésita pendant quelque temps, et quelques-unes de nos Commissions hésitent encore à rechercher systématiquement les réactions tuberculiniques des enfants vaccinés, par crainte d'activer la virulence du BCG.

En compulsant nos observations de trois années sur ce sujet, nous devons définitivement affirmer qu'elles sont complètement inoffensives. Sur plusieurs milliers d'intradérmoréactions effectuées, jamais nous n'avons constaté de phénomènes qui eussent pu être attribués à l'activation du BCG par la tuberculine. Nous ne voyons donc aucune raison pour renoncer à l'emploi de cette méthode biologique qui donne si souvent des renseignements précieux pour les examens cliniques.

Bref, ni les maladies intercurrentes, ni les infections aiguës, ni les réactions tuberculiniques périodiquement répétées, n'ont exercé dans nos observations la moindre influence sur la virulence du BCG dans l'organisme de l'enfant vacciné.

IV. — MORTALITÉ GÉNÉRALE DES ENFANTS VACCINÉS.

Cette question est vivement discutée en ce moment dans la presse européenne. Les premières statistiques publiées par Calmette ont été l'objet de critiques très vives. Nous avons donc jugé nécessaire d'étudier avec une attention spéciale la méthode qui pouvait le mieux permettre d'instituer un contrôle exact des chiffres de mortalité.

Ayant pris en considération toutes les critiques qui ont été faites, nous avons établi, d'après nos observations, le tableau comparatif ci-après de la mortalité des enfants vaccinés et des témoins (tableau VI).

TABLEAU VI. — Mortalité.

CAUSE DU DÉCÈS	0-1 AN		1-2 ANS	
	Non vaccinés en 1927 p. 100	Vaccinés en 1925-27 p. 100	Non vaccinés en 1927 p. 100	Vaccinés en 1925-27 p. 100
Affection gastro intestinale	2,5	2,1	4	0,4
Débilité congénitale . . .	4,6	0,4		
Pneumonie.	1,4	1,2	0,5	1
Tuberculose	0,25	0,4	0,35	0
Méningite	0,58	0,2	0,7	0
Autres affections.	2	1,6	1,5	0,8
Total.	8,3	5,9	4,1	2,2

A titre de comparaison nous avons pris le chiffre de mortalité générale des enfants à Kharkoff en 1927, bien que, pendant les années précédentes, en 1925-1926, cette mortalité eût été bien plus considérable : 9,9 p. 100 et 10,2 p. 100 pour les enfants jusqu'à un an.

Dans ce tableau nous voyons que la mortalité, plus élevée chez les témoins jusqu'à un an, dépend surtout de la débilité congénitale (1,2 p. 100 en plus), ce qui s'explique sans doute par le nombre moindre des prématurés parmi les vaccinés. Mais, même en réduisant de 1,2 p. 100 la mortalité générale des non vaccinés, on trouve que les taux de mortalité sont encore très favorables aux vaccinés.

Cette constatation est encore plus évidente pour le groupe des enfants de un à deux ans, où la débilité congénitale n'intervient pas.

D'après toutes ces données, nous croyons devoir conclure que la mortalité des enfants vaccinés n'atteint pas la normale moyenne pour chaque âge. Le tableau ci-après résume l'ensemble de nos observations.

TABLEAU VII.

CAUSES DES DÉCÈS	ABSENCE du contact			FORMES actives de TBC et présumés TBC			FORMES ouvertes			TOTAL
	0-1 an	1-2 ans	2-3 ans	0-1 an	1-2 ans	2-3 ans	0-1 an	1-2 ans	2-3 ans	
Scarlatine				1						4
Rougeole	1				1					2
Coqueluche				1			1			2
Pneumonie grippale	7	3		1			1			12
Diphthérie					1					1
Maladies intestinales aiguës	7	1		6	1		2			17
Dysenterie				2			1			1
Débilité congénitale										2
Septicémie	2			1						3
Méningite cérébro-spinale					1					1
Spina bifida							1			1
Syphilis congénitale				1						1
Tuberculose							2 + 1			3
Causes inconnues	4									4
Total	18	5		12	5	2	9			51

L'innocuité pratique du BCG étant ainsi démontrée, il nous reste à étudier les propriétés immunisantes du vaccin de Calmette.

V. — LE BCG, VACCIN PRÉVENTIF ANTITUBERCULEUX.

La complexité des problèmes de l'immunité et de la vaccination antituberculeuse nous oblige à être extrêmement prudent dans nos conclusions. Ces problèmes ont été et sont encore étudiés dans le monde entier sur les animaux de laboratoire, les veaux et les singes. Cependant, les résultats de ces expériences, positifs ou négatifs, ne peuvent pas être considérés

comme valables pour l'espèce humaine où nous sommes mis en face de conditions toutes spéciales.

Les résultats de la vaccination antituberculeuse doivent être étudiés sur les animaux et sur l'homme parallèlement, mais indépendamment les uns des autres.

Il est à regretter que nous ne possédions pas de méthodes cliniques plus précises pour démontrer indubitablement l'existence de l'immunité chez tel ou tel sujet. Dans l'état actuel de nos connaissances, les analyses biologiques et physico chimiques des sérumss sont incapables, malgré tout l'intérêt qu'elles présentent, de nous fournir des indications assez précises. Pour résoudre la question de l'existence ou de l'absence de l'immunité résultant de la vaccination, nous ne pouvons nous adresser qu'à l'observation clinique scrupuleuse des enfants vaccinés. Cette observation a surtout de l'importance dans les foyers tuberculeux, lorsqu'elle est confrontée avec les données statistiques comparatives, recueillies sur les enfants non vaccinés, vivant dans les mêmes conditions sociales et hygiéniques et avec un contact tuberculeux à peu près identique.

Nous croyons qu'il est d'abord utile de traiter la question de la sensibilité cutanée à la tuberculine des enfants vaccinés.

Les réactions tuberculiniques organisées méthodiquement devraient s'effectuer comme suit :

Soumettre l'enfant, au deuxième ou troisième mois de la vie, à la réaction de Pirquet contrôlée par la réaction intradermique de Mantoux avec une solution au 1/1.000 de tuberculine brute en cas de résultat négatif. Ces réactions devraient être répétées au moins deux fois par an. Malheureusement, une série de circonstances ne nous permettent pas toujours de réaliser pleinement ce plan; et cependant les données que nous possédons sur un groupe d'enfants assez considérable nous fournissent des indications fort intéressantes. A ce point de vue, notre groupe d'enfants vivant hors d'un contact tuberculeux familial quelconque nous intéresse surtout. Nous soulignons que, même les membres des familles « présumés tuberculeux » sont transférés dans un autre groupe quant à la nature du contact et que nous avons de la sorte la possibilité de suivre l'influence de la seule vaccination isolée de toute influence d'une autre infection virulente provenant du dehors.

Ces documents sont analysés dans le tableau qui suit :

TABLEAU VIII. — Réactions tuberculiniques chez les enfants vaccinés, vivant hors de tout contact tuberculeux.

AGES	NOMBRE d'enfants	RÉACTIONS POSITIVES				POURCENTAGE des disparitions des réactions positives
		Très nettes	Faibles	Total	Pourcentage des réactions positives	
0-6 mois . . .	50	2	43	45	30	66
6-12 mois . . .	58	3	48	21	36	75
1-2 ans . . .	82	5	15	20	24,4	55
2-3 ans . . .	94	15	6	21	22,3	

Nous voyons que, déjà dans la première moitié de leur première année, un pourcentage important des enfants vaccinés donne des cuti-réactions tuberculiniques positives. Les observations journalières montrent que les nourrissons de familles indemnes de TBC, en règle générale, ne réagissent pas à la tuberculine ou, du moins que les réactions positives y sont rares (pas plus de 4 à 5 p. 100 d'après nos expériences). Nous avons donc le droit d'attribuer ce pourcentage considérable des réactions positives à l'influence du vaccin absorbé et à la sensibilisation de l'organisme qu'il a provoquée. Nous croyons que le nombre des réactions positives serait encore plus grand si l'on soumettait systématiquement les enfants vaccinés à des épreuves plus fréquentes. Mais nous doutons de pouvoir y parvenir sur une vaste échelle, à cause de la résistance bien excusable des mères.

Nous constatons, d'autre part, que l'apparition des réactions faiblement positives caractérise la première année de la vie. Elles ont tendance à disparaître complètement après un certain temps (un à deux ans). Avec l'âge des enfants vaccinés, le tableau change donc : le nombre des réactions faiblement positives diminue, alors que celui des réactions nettement positives s'accroît, et celles-ci semblent persistantes.

Le tableau IX montre les relations des réactions tuberculiniques avec les contacts tuberculeux chez les enfants vaccinés.

Les réactions faiblement positives n'apparaissent en nombre

important qu'au cours de la première année de la vie. Le pourcentage de celles qui disparaissent est manifestement réduit déjà entre six et douze mois, comparativement au groupe précédent, et il atteint les chiffres minima dans le groupe d'âge suivant.

TABLEAU IX. — Réactions tuberculiniques chez les enfants vaccinés dans les familles comprenant un malade tuberculeux actif ou présumé tuberculeux.

AGES	NOMBRE d'enfants	RÉACTIONS POSITIVES				POURCENTAGE des disparitions des réactions positives
		Très nettes	Faibles	Total	Pourcentage des réactions positives	
0-6 mois . .	49	5	10	15	30	60
6-12 mois . .	68	8	47	55	40	48
1-2 ans . .	72	12	2	14	19,4	44,3
2-3 ans . .	46	12	3	15	32,5	

Voici le tableau des réactions tuberculiniques chez les enfants vaccinés vivant dans des familles bacillifères depuis les premiers jours de leur vie (tableau X).

TABLEAU X. — Réactions tuberculiniques chez les enfants vaccinés des familles bacillifères.

AGE	NOMBRE d'enfants	RÉACTIONS POSITIVES				POURCENTAGE des disparitions des réactions positives
		Très nettes	Faibles	Total	Pourcentage des réactions positives	
0-6 mois . .	27	13	5	18	66	4
6-12 mois . .	30	16	1	17	57	0
1-2 ans . .	24	12	1	13	54	0
2-3 ans . .	12	9		6	75	

Non seulement le pourcentage des réactions tuberculiniques positives est plus grand et dès le plus bas âge, mais ces réactions sont toujours beaucoup plus nettes et n'ont pas de tendance à disparaître.

Ce fait, ainsi que les particularités épidémiologiques de l'existence des enfants de ce groupe, nous conduisent à conclure que les enfants vaccinés par le BCG et vivant dans un milieu sûrement bacillifère, s'infectent pour la plupart avec des bacilles tuberculeux virulents provenant du milieu familial dans lequel ils vivent.

Nous nous trouvons là en présence d'une véritable expérience instituée par la nature elle-même; les enfants sont vaccinés, et ensuite, le plus souvent pendant les premiers mois de leur vie, ils subissent la contamination tuberculeuse dans les conditions naturelles. La surveillance minutieuse de ces enfants, de leur croissance, de leur morbidité et de leur mortalité par tuberculose doit fournir des indications précieuses pour juger de l'effet immunisant du vaccin. Dans le tableau IV « C » (page 407), nous avons vu que sur 118 enfants de familles bacillifères, 102 (86,5 p. 100) se sont développés normalement. Nous y comprenons les enfants à croissance normale même fortement réagissants à la tuberculine, alors que 3 (2,6 p. 100) sont un peu au-dessous de la normale et 13 (10,9 p. 100) atteints de différentes formes de tuberculose (adénopathies trachéo-bronchiques) peu accentuées. Un cas, classé dans la colonne « Autres formes de tuberculose » se rapporte à un enfant qu'on croyait atteint de pneumonie caséeuse. Les examens ultérieurs montrent qu'il s'agissait d'une congestion du poumon gauche avec tendance à la résorption.

Le médecin qui donne ses soins aux nourrissons de familles bacillifères, par conséquent sujets à de fréquentes surinfections, sait combien est fréquent l'état maladif de ces enfants qui souffrent continuellement de bronchites et ont peu de résistance vis-à-vis des maladies du jeune âge. Beaucoup d'entre eux présentent des localisations tuberculeuses variées. Après de longues observations et des comparaisons avec les enfants non vaccinés des foyers tuberculeux, nous avons acquis cette impression très nette que *les enfants vaccinés avec le BCG sont beaucoup plus résistants*. Nous ne voulons citer aucun chiffre, nous réservant de revenir sur ce sujet après examen minutieux des enfants non-vaccinés de familles bacillifères. Mais notre impression est fondée sur des observations cliniques prolongées.

Des faits plus précis se dégagent de l'étude de nos documents

sur la mortalité par tuberculose dans le groupe analysé. Jusqu'à présent (janvier 1929), nous avons pu constater, parmi les enfants vaccinés, seulement trois décès qui peuvent être plus ou moins justement attribués à la tuberculose.

L'un de ces enfants, âgé de dix mois et demi, est décédé à Kharkoff en 1925, avec tous les symptômes d'une tuberculose pulmonaire. Les deux autres sont morts hors de Kharkoff; l'un vacciné à Lougansk, âgé de trois mois et demi, avec des symptômes de « méningite tuberculeuse », et l'autre vacciné à Kharkoff, parti pour Donnebasse, y mourut âgé de huit mois, d'après les renseignements fournis, d'une pneumonie aiguë banale.

Calmette, dans ses enquêtes, a constaté que la mortalité par tuberculose, pour les enfants non vaccinés vivant dans les familles bacillifères, de zéro à un an, n'est pas inférieure à 25 p. 100. Ce chiffre a été critiqué de différents points de vue et trouvé par certains très exagéré; nous avons donc jugé nécessaire de faire nous-même notre enquête dans les conditions particulières où nous sommes placé et d'après notre propre plan.

Nous rapportons ici les données de trois villes de l'Ukraine où tous les enfants ont été suivis par les dispensaires, et de Kharkoff où il ont été également suivis comme les enfants vaccinés (tableau XI).

TABLEAU XI. — Mortalité par tuberculose des enfants dans les familles avec malades bacillifères (témoins non vaccinés).

	JUSQU'A 1 AN			DE 1 A 2 ANS		
	Surveillés	Décédés	p. 100	Surveillés	Décédés	p. 100
	—	—	—	—	—	—
Kharkoff	425	18	14,4	75	7	9,3
Lougansk	12	4	33	21	4	19
Dniepropetrovsk . . .	64	12	18,7	68	5	7,3
Total.	201	34	16,9	164	16	9,7

La simple comparaison des chiffres de mortalité par tuberculose des enfants non vaccinés avec celle des vaccinés (16,9 p. 100 au lieu de 2,4 p. 100 jusqu'à un an et zéro au lieu de

9,7 de un à deux ans) parle de toute évidence en faveur de la vaccination.

Nous sommes prêts d'avance à accueillir toutes les objections possibles. Nous savons très bien que « les bacillifères ne sont pas tous également contagieux », que beaucoup d'entre eux ont des périodes pendant lesquelles les bacilles ne sont plus expectorés ; que les conditions sanitaires et hygiéniques sont très diverses dans un foyer tuberculeux, etc., et nous prenons toujours en considération ces circonstances, mais ces variations sont les mêmes chez les non vaccinés que chez les vaccinés.

Il est certain pour nous, d'après nos documents, que le taux moyen de mortalité par tuberculose des enfants non vaccinés jusqu'à un an des familles bacillifères est de 16,9 p. 100.

Les discussions des rapports sur le BCG à la quatrième conférence de la tuberculose de l'Union des Républiques Sovié-tiques, qui vient d'avoir lieu à Tifflis, ont nettement appuyé nos conclusions. Le Dr Pohitonova (Moscou) rapporta que, d'après les chiffres du dispensaire modèle du Commissariat de la santé publique (NKZ), la mortalité par tuberculose des enfants jusqu'à un an, dans les familles bacillifères, est de 16,07 p. 100. Le représentant de la commission du BCG de Kasan rapporte que sur 104 enfants suivis dans les familles bacillifères, de zéro à un an, 17 cas de décès par tuberculose ont été enregistrés, c'est-à-dire 16,3 p. 100. Il semble que la concordance frappante de ces chiffres moyens de mortalité en Ukraine, à Moscou et à Kasan, prouve que, pour le milieu social où travaillent nos dispensaires, ils sont très proches de la réalité.

Quoique le nombre de nos documents soit relativement restreint, nous basant sur les faits et observations qui précèdent, nous estimons que les résultats actuellement acquis nous permettent de considérer la vaccination des nouveau-nés par le BCG comme un moyen efficace d'augmenter leur résistance envers l'infection tuberculeuse virulente.

En terminant, nous voulons attirer l'attention sur certains points qui ont une grande importance pour la solution du problème dont il s'agit.

Avec la vaccination des enfants *per os*, nous ne pouvons jamais être absolument sûrs qu'une quantité suffisante de bacilles a pénétré dans l'organisme et qu'ils n'ont pas été

expulsés ou éliminés promptement par un péristaltisme intestinal plus ou moins violent. Aussi croyons-nous nécessaire de mettre à l'étude la question de la *vaccination par voie sous-cutanée* sur un petit nombre d'enfants, à titre d'essai, d'autant plus que l'innocuité de cette méthode résulte des nombreuses observations de Calmette. La méthode et les doses, cela va sans dire, devront être discutées et définies par des commissions techniques spéciales.

L'autre question, non moins grave, se rapporte à ce fait que le vaccin, si efficace qu'il puisse être, ne peut pas agir immédiatement après son administration. Il faut un certain temps pour qu'il détermine dans l'organisme de l'enfant vacciné des réactions d'immunité. Ce délai, d'après Calmette et Guérin, est d'à peu près un mois, et, pendant ce temps, il va sans dire que les enfants devraient être isolés des malades bacillifères. Par malheur, jusqu'à présent, nous ne sommes pas parvenus à organiser cet isolement. Toutes les commissions d'études du BCG devront porter leur plus grande attention sur ce fait, pour ne pas fausser leurs conclusions, et il sera indispensable que le groupe témoin des enfants non vaccinés de familles bacillifères soit placé dans des conditions exactement identiques à celles des enfants vaccinés.

L'expérience scientifique projetée actuellement dans une série de villes de l'Union des Républiques soviétiques (SSSR) doit être effectuée selon toutes ces règles.

CONCLUSIONS.

1^o La vaccination des nouveau-nés par le BCG d'après la méthode et aux doses préconisées par Calmette, n'influe en aucune manière, cliniquement, sur le bien-être, la température et l'état gastro-intestinal des enfants vaccinés.

2^o Les enfants vaccinés, dans leur immense majorité, se développent tout à fait normalement.

3^o Le pourcentage des enfants retardés dans leur croissance ne dépasse pas les taux moyens des consultations de nourrissons, d'après notre expérience de plusieurs années.

4^o On ne parvient pas à découvrir une influence quelconque, cliniquement définissable, des affections intercurrentes, des

infections aiguës, ni des réactions tuberculiniques périodiquement renouvelées, sur l'accroissement de la virulence du BCG dans l'organisme de l'enfant vacciné.

5° La mortalité générale des vaccinés ne dépasse pas les chiffres moyens de l'âge correspondant.

6° Les autopsies des enfants morts de maladies intercurrentes, à différents intervalles après la vaccination (de huit jours à six mois), n'ont révélé ni dans les intestins, ni dans le système lymphatique, ni dans les organes viscéraux, de lésions anatomo-pathologiques ou microscopiques qu'on pourrait mettre au compte des qualités pathogènes du BCG.

7° Nous basant sur les observations citées ci-dessus, nous considérons la vaccination des nouveau-nés d'après la méthode de Calmette comme une mesure pratiquement et complètement inoffensive.

8° Les enfants vaccinés vivant apparemment hors de tout contact tuberculeux donnent, dans un pourcentage considérable de cas, des cuti-réactions tuberculiniques positives. Ces réactions dépendent probablement de la quantité du vaccin qui a pénétré dans l'organisme. Leur apparition n'est soumise à aucune règle évidente. Leur intensité est plutôt faible, et elles ont une tendance à disparaître assez rapidement.

9° Les enfants vaccinés qui vivent dans un milieu manifestement tuberculeux donnent dans un plus important pourcentage de cas de fortes réactions tuberculiniques dès les six premiers mois de la vie. Nous croyons que ces fortes réactions sont dues à l'infection tuberculeuse virulente venant de l'extérieur.

10° Le plus grand nombre de ces enfants, malgré la présence d'une infection tuberculeuse virulente exogène et d'une forte réaction tuberculinique, ont une croissance pleinement satisfaisante.

11° Un petit groupe seulement d'enfants de familles bacillifères présente le tableau d'une tuberculose cliniquement décevable, d'évolution généralement bénigne et qui affecte surtout la forme d'adénopathie trachéo-bronchique.

12° La mortalité par tuberculose des enfants vaccinés vivant dans les familles bacillifères est jusqu'à maintenant infime.

13° Nous fondant sur ce qui précède, nous sommes porté à

considérer l'immunisation des nouveau-nés par le BCG comme une mesure capable d'augmenter la résistance envers les infections tuberculeuses virulentes ultérieures.

14° Pour tirer des conclusions définitives, un délai d'observation plus long et des données plus complètes, relatives aux enfants non vaccinés, sont nécessaires.

15° Les qualités immunisantes du BCG étant admises, il y a lieu de tenir compte des considérations suivantes :

a) Peut-être, en raison de l'originalité de la méthode de vaccination *per os*, doit-on penser que, dans certains cas, l'imprégnation du système lymphatique de l'organisme par le BCG est insuffisante, par suite de l'élimination trop rapide des éléments bacillaires.

b) La difficulté très grande, dans les conditions où nous sommes placés, d'isoler les enfants vaccinés de la source d'infection pendant le temps nécessaire à l'établissement de l'immunité.

16° Les considérations exposées dans le paragraphe qui précède nous portent à penser que les échecs possibles de l'immunisation ne peuvent valablement pas être mis au compte d'une insuffisante efficacité du vaccin.

PATHOGÉNIE DES SPIROCHÉTOSES ICTÉROGÈNES

(DEUXIÈME MÉMOIRE) (1)

L'ACTION PATHOGÈNE DES MICROBES DE SORTIE DANS LES SPIROCHÉTOSES.

par le Prof. G. SANARELLI et le Dr G. PERGHER,

Directeur Assistant
de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Rome.

(AVEC DEUX PLANCHES)

I. — Comportement des Leptospires dans l'organisme du cobaye.

1^o ACTION SPÉCIFIQUE PROPRE DES LEPTOSPIRES.

Il ressort des observations contenues dans le précédent mémoire, que l'épisode final du processus morbide provoqué chez les animaux par l'inoculation du *Leptospira icteroides* de Noguchi, est toujours occasionné par la brusque intervention de microbes étrangers. On ne pouvait donc déduire, de ces expériences sur les animaux, un jugement précis sur l'action spécifique concernant les seuls Leptospires. Il fallait éclaircir ce point, en dissociant l'action des Leptospires eux-mêmes de celle des microbes qui, généralement, interviennent ensuite, pourachever l'œuvre commencée par les premiers.

A ce propos, notre tâche fut rendue facile, non seulement par des observations accidentelles, mais aussi par l'étude des protocoles de nombreux cobayes, sacrifiés en temps divers après l'injection du virus, afin de réaliser le plus grand nombre possible de passages des Leptospires et d'augmenter au plus haut degré l'action pathogène de ces microbes.

Dans ces cas, nous avions affaire moins fréquemment à des

(1) Voir Ces *Annales*, 43, janvier 1929.

microbes de sortie, bien que nombre d'animaux fussent sacrifiés même plusieurs jours après l'inoculation du virus spirochétose, au cours de stades avancés ou tardifs de la maladie et, parfois, avec les premières manifestations de l'ictère.

Par l'étude de ces animaux, en proie à une infection pure de Leptospires, il nous a été possible d'éclaircir l'action pathogène de ces derniers.

Voici brièvement nos constatations :

Les Leptospires, injectés au cobaye à dose mortelle — en faisant abstraction des suites éventuelles qui peuvent surgir quelquefois par l'irruption soudaine de microbes étrangers — exercent une action pathogène propre, assez typique et uniforme.

Ajoutons que cette action n'est pas très apparente. Par des observations faites en série, en sacrifiant, à différentes périodes, plusieurs groupes de cobayes — à partir de quarante-huit heures après l'inoculation du virus — nous avons constaté que jusqu'au quatrième ou cinquième jour, on ne voit jamais, à l'autopsie, d'altérations manifestes.

Généralement, les Leptospires inoculés dans le péritoine font leur première apparition dans le sang périphérique au quatrième jour, et les premiers signes de leur action spécifique apparaissent pendant la cinquième ou la sixième journée. Les signes les plus précoce, et en même temps les plus caractéristiques, sont : 1^o les pétéchies dans les poumons, en raison desquelles la surface des lobes, qui présente un aspect semblable à celui que l'on rencontre chez les cobayes morts de spirochétose ictéro-hémorragique, a été comparée aux ailes d'un papillon du genre *Vanessa*; 2^o les sussusions hémorragiques dans le tissu cellulo-graisseux des gouttières lombaires; 3^o parfois la néphrite, révélée par des traces d'albumine dans les urines.

A partir du sixième jour on peut aussi observer, mais exceptionnellement, les signes de légers troubles intestinaux ; rarement, on trouve la rate un peu grossie ; plus rarement encore, une sérosité péritonéale d'aspect hématique.

Cependant, il faut remarquer que chez quelques cobayes trouvés à l'autopsie complètement envahis par les Leptospires, ces altérations — qui ne sont d'ailleurs pas graves — peuvent

faire défaut, de même que dans quelques cas on peut rencontrer des suffusions sanguines dans les poumons et dans les gouttières lombaires, sans que l'animal ait présenté pendant sa vie, ni fièvre, ni amaigrissement.

Des constatations purement accidentelles nous ont mis à même de surprendre la présence des Leptospires dans le courant sanguin de cobayes qui n'avaient jamais présenté de troubles dans leur état de santé, même plusieurs jours après l'inoculation du virus.

Une fois on trouva les Leptospires dans le sang trente-trois jours après l'injection dans le péritoine.

Il s'agissait d'un cobaye de 240 grammes, inoculé le 2 décembre. Le paroxysme fébrile écoulé, on pratique, le 9 décembre, une aspiration de sang du cœur et, par les cultures, on met en évidence les Leptospires. Le 28 décembre, deuxième aspiration de sang du cœur; on isole un paratyphique. Le 4 janvier, c'est-à-dire trente-trois jours après l'injection péritonéale, le poids du cobaye était de 325 grammes. Etat de santé florissant. Troisième prélèvement de sang du cœur; constatation des Leptospires au moyen des cultures. Quatrième saignée le 24 janvier; à ce moment, le cobaye pesait 370 grammes. Depuis, l'animal commença à décliner et succomba enfin le 10 février, savoir trente-sept jours après la dernière constatation de Leptospires, à la suite d'un processus pulmonaire de date ancienne. A l'autopsie, aucune altération des viscères relevant des Leptospires.

Dans ce cas donc, les Leptospires ont pu se multiplier et circuler en grande quantité dans le sang pendant plus d'un mois, seuls ou accompagnés d'un *B. paratyphique*, sans donner de signes évidents de leur action.

Encore plus significatives ont été les constatations de Leptospires chez des animaux qui avaient succombé à la suite d'infections de sortie.

Un cobaye de 235 grammes fut inoculé le 1^{er} janvier avec la dose habituellement mortelle de virus. La fièvre dura du 4 au 9, atteignant 40° sans aucune diminution de poids. Prélèvement du sang du cœur le 8 janvier. Température 39°; poids s'élevant à 275 grammes; on constate les Leptospires et en même temps un *B. proteus*. Le poids de l'animal augmenta encore jusqu'à atteindre 285 grammes le 12 janvier. Soudainement, ce poids diminue. Le 13 janvier, il est de 240 grammes. Le lendemain, le cobaye meurt. A l'autopsie, on trouve une gastro-entérite intense, provoquée par l'invasion brusque d'un *B. paratyphique*. Aucune altération relevant des Leptospires. Ceux-ci étaient, néanmoins, en grande quantité dans le péritoine, le foie, les reins.

Dans ce cas, les Leptospires restèrent vivants dans l'organisme du cobaye pendant quatorze jours, même accompagnés

d'un microbe de sortie (*B. proteus*), sans donner lieu à aucune altération. La catastrophe avait été, évidemment, déterminée par l'apparition soudaine de la septicémie paratyphique.

Quand les microbes de sortie n'apparaissent pas sur la scène, il semble que l'animal n'éprouve aucun trouble de la présence du Leptospire, et en effet il supporte alors impunément des quantités même considérables de virus.

Nous en avons observé quelques cas. En voici un :

A un petit cobaye de 250 grammes, on injecte (8 juillet) 2 cent. cubes de virus. Le lendemain, apparition de la fièvre (39°5) et diminution du poids, qui décline pendant quelques jours. Mais neuf jours après (18 juillet), bien qu'avec une température rectale de 38°9, l'animal avait déjà recouvré son poids primitif. On pratiqua alors une deuxième injection péritoneale de 3 cent. cubes de virus. L'animal n'en ressentit rien; la température s'éleva durant quelques jours (jusqu'à 39°1), mais le poids de l'animal continua de s'accroître. Un prélèvement de sang du cœur, effectué quarante-huit heures après la seconde inoculation, décela des Leptospires. Le 4 février, le cobaye avait atteint 310 grammes. Troisième inoculation péritoneale (3 cent. cubes de virus). Les effets furent encore nuls. Le 13 février, 4^e injection (3 cent. cubes de virus). Le poids de l'animal continua son ascension jusqu'à atteindre, le 20 février, 330 grammes. Le cobaye fut alors définitivement placé dans la section des immunisés.

Voici un autre cas intéressant parce qu'il est resté unique entre toutes nos expériences.

Dans le péritoine d'un cobaye de 280 grammes on injecte (20 octobre) une émulsion d'organes riches en Leptospires. L'animal présente quelques élévations fébriles, mais commence tout de suite à diminuer progressivement, quoique lentement, de poids. Le 20 décembre, savoir soixante et un jours après l'inoculation virulente, il meurt, pesant alors 220 grammes. A l'autopsie, gastro-entérite intense, due à un paratyphique de sortie. Leptospires dans le foie, dans les reins, dans les glandes surrénales.

Il faut en conclure que les Leptospires, même doués de virulence, peuvent pulluler longtemps dans l'organisme sans donner lieu à des troubles manifestes, ou, tout au plus, à des élévations fébriles et à des lésions peu importantes et incapables de causer, seules, la mort. Les Leptospires peuvent demeurer longtemps dans le sang et les tissus, non seulement sans troubler l'état général de l'animal, mais aussi coexistant avec d'autres microbes. Cela rappelle l'observation de Monti (1),

(1) Epidemiologia, patologia e patogenesi della spirochetozi icterogena.
Bull. Soc. Med. Chir. di Pavia, 4 aprile 1917.

qui a constaté que, pendant la période d'invasion, les malades atteints d'ictère infectieux ne s'aperçoivent même pas qu'ils sont fébricitants.

Remarquons tout de suite que nous avons observé des cas dans lesquels, par contre, la disparition des Leptospires s'est effectuée avec une surprenante rapidité.

On a déjà dit que, dans un grand nombre de cas très graves, c'est-à-dire caractérisés par l'intensité remarquable des lésions viscérales, des hémorragies et de l'ictère, la recherche des Leptospires reste souvent stérile.

En effet, dans les infections qui aboutissent par exemple à une colibacilleose généralisée, la recherche du Leptospire est le plus souvent négative, tant par l'examen à l'ultra qu'avec les cultures. Seulement chez quelques sujets on trouva ces micro-organismes dans le foie, mais en quantité toujours minime et complètement immobiles.

On dirait que les Leptospires tendent à disparaître à la hâte, après avoir ouvert la voie à des microbes plus dangereux, méfiant auxquels ils abandonneraient la tâche d'achever promptement ce qu'ils ont déjà préparé insidieusement.

D'ailleurs, on sait très bien que le dépistage des spirochètes reste aussi assez fréquemment négatif, même chez l'homme infecté : par exemple, dans la maladie de Weil.

Si l'on veut faire abstraction des résultats négatifs souvent relatés par Noguchi, par Le Blanc et par tant d'autres chercheurs dans la fièvre jaune, il faut rappeler les observations nombreuses faites à Sumatra par Baermann et Smits (1). Ces auteurs, qui ont étudié de nombreux cas de maladie de Weil, ont déclaré, tout récemment, avoir isolé les spirochètes dans 196 cas, tandis que cet isolement ne leur fut pas possible dans 150 autres cas. Dans les formes classiques de la maladie de Weil, l'isolement des spirochètes, après une seule injection péritoneale, même abondante, de sang (5-10 cent. cubes) chez les cobayes, fut obtenu par ces auteurs dans 20 p. 100 seulement des cas. S'ils pratiquaient trois injections quotidiennes successives de sang, le pourcentage des isolements s'élevait à 70 p. 100.

1) Diagnose, Klinik, Epidemiologie und Therapie der kurzfristigen Weilschen Erkrankung. *Centralbl. f. Bakter.*; Orig. 1928, Bd 105, S. 345.

Donc, 30 p. 100 des insuccès semblent dépendre d'imperfections techniques inévitables.

Uhlenhuth et Hermann ont également démontré (1) que les injections d'émulsions d'organes de cobaye infectés par *Sp. icterohæmorragiae* peuvent reproduire chez d'autres cobayes la maladie de Weil, même si les agents spécifiques ne peuvent être décelés ni au microscope, ni par les cultures.

Si l'on remarque que, dans les milieux acides, même dans ceux qui présentent une acidité très faible, on constate facilement la lyse des spirochétidés, on peut s'expliquer pourquoi ces micro-organismes sont si souvent introuvables, étant donné l'état d'acidose que parfois on vérifie dans ces infections et comme, en effet, nous l'avons observé dans quelques expériences sur les lapins.

2^e LEPTOSPIRES ET MICROBES.

Puisque les cas pour lesquels la recherche des Leptospires reste négative concernaient presque toujours des cobayes qui succombaient à la brusque apparition d'une infection de sortie, nous avons voulu faire quelques expériences *in vitro* pour rechercher comment se comportent les Leptospires vis-à-vis d'autres microbes.

Bien que des observations faites *in vitro* on ne puisse pas déduire ce qui se passe dans l'organisme vivant, nous verrons, néanmoins, que ces recherches ne furent pas inutiles.

Nos observations faites sur des tubes de Kaneko,ensemencés respectivement avec des microbes différents, nous ont donné les résultats suivants :

Si l'on ensemence ensemble de petites quantités de Leptospires et des streptocoques hémolytiques, on assiste au développement d'une culture mixte. Les deux micro-organismes se multiplient simultanément.

Si l'on ajoute quelques gouttes d'une culture de streptocoques à une culture de Leptospires très développée, les streptocoques se multiplient parfaitement au milieu des Leptospires,

(1) Neue Untersuchungen über die Umwandlung der *Spirochæta pseudo-icterogenes* (Wasserspirochaeta) in die *Spirochæta icterogenes* (Erreger der Weilschen Krankheit). *Mediz. Klin.*, 22 apr. 1927, p. 599.

sans nuire, en apparence, à ces derniers micro-organismes. Mais si l'on ajoute quelques gouttes d'une culture de Leptospires à une culture luxuriante de streptocoques en milieu Kaneko, les premiers micro-organismes ne se développent pas; bien plus ils se détruisent. Cependant ils ne meurent pas vite. En effet, si avant vingt jours on filtre la culture sur bougie Berkefeld et si l'on cultive le filtrat sur Kaneko, on obtient de nouveau une culture pure de Leptospires.

Nous avons obtenu des résultats presque analogues en employant le staphylocoque doré et *Sarcina lutea*.

Le colibacille virulent se montre, au contraire, beaucoup plus nuisible pour les Leptospires. Avant tout, il acidifie, quoique faiblement, le milieu Kaneko. Cette acidité cause la destruction des Leptospires. En effet, le moindre degré d'acidité est absolument incompatible avec la vie des spirochétidés (1).

Nous avons répété les mêmes expériences avec *Sp. icterohaemorragiae* et *Sp. autumnalis* (type A), que nous avions pu nous procurer grâce à l'obligeance du professeur Pettit, de l'Institut Pasteur.

En ajoutant à des cultures luxuriantes de ces deux spirochétidés quelques gouttes de culture de streptocoques ou de staphylocoques, on peut observer deux sortes de résultats : 1^o les microbes que l'on a ajoutés ne se développent pas, et alors les spirochètes continuent à vivre et à pulluler; 2^o les microbes ajoutés se développent et s'implantent tout de suite, et alors on constate la disparition, par lyse, des spirochètes. Mais dans ces cas, la lyse signifie aussi la mort. En effet, si l'on ensemente le filtrat dans du Kaneko vierge, on n'obtient aucune prolifération des spirochètes.

Les expériences *in vitro* apportent l'explication de ce que l'on observe parfois *in vivo*. Citons-en quelques exemples.

1^o Dans le péritoine d'un cobaye de 215 grammes on injecte (16 janvier) 1 cent. cube de culture *Sp. icterohaemorragiae*. Après une courte période de fièvre et une diminution progressive du poids, l'animal meurt, avec ictere, au sixième jour, présentant un tableau anatomique égal à celui que l'on rencontre chez les cobayes qui ont succombé à l'inoculation du *Lp. icteroides*. Les spirochètes n'étaient pas décelables dans le sang, mais étaient abon-

(1) M. ZURLER. Zur Hydrobiologie der *Spirochæta icterogenes* syn. *biflexa* in den Tropen. *Centralbl. f. Bakter., 4 Mitt. Orig.* 1928, p. 384.

dants dans le foie. Les cultures dans les milieux ordinaires révèlèrent la présence de microcoques et de strepto-bacilles dans le sang aussi bien que dans le foie. Les cultures du même organe en milieu Kaneko donnèrent lieu au développement des *seuls spirochètes*. Evidemment, la présence de peu de microbes — peut-être pas très actifs — n'ont pas dérangé dans ce cas le développement des spirochètes en culture pure.

2° Un autre cobaye, de 225 grammes, inoculé (16 janvier) dans le péritoine avec 1 cent. cube de culture de *Sp. icterohaemorragiae*, meurt, avec ictere, neuf jours après et ayant présenté un paroxysme fébrile de cinq jours. Tableau anatomique et bactériologique d'une septicémie à streptocoques très grave. Spirochètes seulement dans le foie. Mais les ensemencements de cet organe en milieu Kaneko ne donne lieu qu'au développement de streptocoques. Dans ce cas, la quantité excessive ou un pouvoir particulier antibiotique des streptocoques, a empêché la multiplication des rares spirochètes.

3° Un autre cobaye, de 180 grammes, meurt icérique neuf jours après l'injection de *Sp. icteroides*, avec le tableau d'une septicémie à streptocoques très grave. Les bords du foie étaient jaunâtres, ce qui fit soupçonner un certain degré de stéatose. Mais l'examen histologique révéla des foyers nécrotiques, très riches en streptocoques. Nombreux Leptospires dans le sang et dans le foie. Les ensemencements en Kaneko donnèrent lieu au développement simultané de Leptospires et de streptocoques. Dans ce cas, donc, il n'y eut aucun signe d'antibiose entre les deux micro-organismes.

De ces observations il résulte que, dans les phénomènes de concurrence et d'antagonisme avec d'autres germes, les spirochétidés semblent peu doués de résistance vitale. Cependant, cela n'exclut pas que, dans la nature, puissent se réaliser des conditions particulières, capables de donner lieu aux résultats les plus variés.

On comprend ainsi, peut-être, pourquoi la question des microbes de sortie dans les infections à spirochétidés, n'a pas, jusqu'aujourd'hui, attiré d'une façon particulière l'attention des chercheurs.

De nos recherches il ressort encore un autre fait. C'est que, vis-à-vis de l'extrême gravité des lésions rencontrées à l'autopsie (gravité qui coïncide le plus souvent avec le tableau d'une septicémie), on est amené à supposer que les germes responsables de ce profond dérangement sont doués d'une grande virulence.

Mais cette supposition apparemment logique s'est démontrée expérimentalement fausse. Les altérations anatomiques ne sont pas en rapport avec l'activité pathogène du microbe responsable. Au contraire, ce dernier, essayé chez des animaux neufs, se montre souvent doué d'un pouvoir pathogène bien faible et

parfois nul. Par exemple, le streptocoque (qui est le microbe que l'on note le plus fréquemment, surtout dans les cas septicémiques et qui dans les milieux habituels donne de luxuriantes cultures) n'est pas, en général, capable, à dose modérée, de tuer un cobaye par injection péricitoneale!

Une fois, nous avions attribué, de prime abord, de graves lésions trouvées à l'autopsie d'un cobaye, à l'action d'un bacille anaérobiose qui avait complètement envahi le sang. Or, ce microbe, cultivé et inoculé, se montra absolument dépourvu d'action pathogène.

Parfois, nous avons trouvé, comme microbes de sortie envahissant largement le sang et les organes, des bacilles du groupe *B. subtilis*.

Ces constatations et tant d'autres analogues, nous ont portés à admettre que l'invasion de microbes de sortie dans un organisme infecté par le Leptospire, doit être attribuée, surtout, à la diminution ou à la disparition de la résistance de l'animal envahi. Il est probable que les microbes de sortie trouvent le champ libre parce que les Leptospires ou les Spirochêtes ont détruit toute défense cellulaire ou humorale. Toutefois, ils entrent en action dans des conditions particulièrement propices.

Parfois, en effet, lors de l'injection péricitoneale d'une émulsion d'organes d'un cobaye sacrifié au début du paroxysme fébrile, on crut avoir employé un matériel pur, contenant des Leptospires. Les ensemenagements de contrôle révélèrent, au contraire, que le matériel était contaminé, par exemple, par quelques streptocoques ou colibacilles. S'il s'agit de streptocoques, ils augmentent vite leur virulence quand on les injecte dans le péritoine avec des émulsions d'organes ou du sang, et l'animal succombe bientôt à une septicémie à streptocoques. Mais dans le cas de colibacilles, les faits se déroulent d'une façon différente.

Ils peuvent rester inactifs, jusqu'au moment où le paroxysme fébrile, dû aux Leptospires, a préparé les conditions d'anergie. Le moment critique arrivé, les microbes latents se déchaînent et l'animal meurt.

II. — Les microbes de sortie dans les infections par *Sp. icterohæmorragiæ* et *Sp. autumnalis*.

Au fur et à mesure que nos expériences démontraient la façon singulière dont se comportaient les Leptospires chez les diverses espèces animales, nous étions amenés à des conceptions un peu différentes de celles qui sont admises aujourd'hui, en ce qui concerne les limites du pouvoir spécifique des agents morbigènes en général, et des spirochétidés en particulier.

Toutefois, nous nous sommes doutés que les résultats obtenus relevaient peut-être d'une insuffisance de virulence de la souche de *Lp. Palmeiras*, que Noguchi nous avait envoyée. En outre, puisque les recherches de Puntoni et d'autres bactériologistes avaient démontré l'identité ou, du moins, la profonde affinité biologique entre le Leptospire de Noguchi et les spirochètes de la maladie de Weil, nous avons aussi voulu essayer chez les animaux l'action d'autres spirochétidés.

Nous avons, en conséquence, étudié l'action de *Sp. icterohæmorragiæ* et de *Sp. autumnalis*, l'agent de la « fièvre d'automne » du Japon. Ce dernier spirochétidé (type A), décrit par Katamura et Hara, a beaucoup d'affinité avec celui de la maladie de Weil (1).

On sait que la fièvre d'automne, connue en Japon sous le nom de « Akiyami » est plutôt bénigne, ainsi que, du reste, l'ictère infectieux de Weil en Europe. La maladie de Weil donne, dans les régions européennes, un pourcentage de mortalité de 3 à 5, tandis qu'au Japon, et, particulièrement, en Egypte, elle acquiert des formes beaucoup plus graves, jusqu'à donner une mortalité de 30 à 50 p. 100.

A. — INFECTIONS PAR *Sp. icterohæmorragiæ*.

Nonobstant que, avant ou après la découverte des médecins japonais, la nature polymicrobienne de l'ictère hémorragique ait été admise par beaucoup d'auteurs, et que l'on ait même

(1) STEFANOPOULU et HOSOYA, Sur les spirochétidés, agents de la fièvre d'automne du Japon. *C. R. Soc. de Biol.*, 5 mai 1928.

pensé, en se basant sur les constatations cliniques, à la possibilité d'un phénomène synergique, il est étrange que, dans les expériences de laboratoire, personne n'ait tenu compte de ces précédents.

De nos expériences, il ressort que, dans les spirochétoses hémorragiques, les recherches sur les mobilisations bactériennes présentent une importance égale à celle mise en lumière dans les infections par *Lp. icteroides*.

Avec la souche très virulente de *Sp. icterohæmorragiæ*, que nous avions reçue grâce à l'obligeance de A. Pettit, nous avons répété beaucoup d'expériences chez les cobayes.

Après l'inoculation péritonéale de 0,5-1 cent. cube de culture de ce spirochète en milieu Kaneko, la fièvre se manifestait (38°8-40°) à partir du troisième jour et persistait jusqu'à la veille de la mort. Celle-ci survenait, d'ordinaire, au bout de huit à neuf jours. Le poids ne diminue jamais, et, ~~chez~~ les cobayes très jeunes (140-200 grammes) il augmente régulièrement à partir du lendemain de l'injection virulente. A la veille de la mort, il reste toujours supérieur au poids initial, malgré la légère diminution qui se manifeste dans la période de l'hypothermie et du collapsus.

Dans sa marche, donc, l'infection expérimentale par *Sp. icterohæmorragiæ*, ressemble à celle par *Lp. icteroides*.

Aussi, le tableau anatomique demeure (à peu près) toujours le même : ictère général, suffusions hémorragiques dans les parois abdominales, dans les ganglions inguinaux et dans les gouttières lombaires ; sérosité hématique dans le péritoine et dans la plèvre ; rate parfois grossie et congestionnée ; foie congestionné ou, quelquefois, anémié ou jaunâtre ; pétéchies et taches hémorragiques dans les poumons ; estomac avec des hémorragies punctiformes ; urine albumineuse, etc.

Cependant les recherches bactériologiques nous apportaient une vraie surprise :

Les 17 cobayes morts à la suite de l'inoculation des spirochètes de Inada et Ido, présentèrent toujours le tableau bactériologique d'une septicémie à streptocoques, pure et massive. Dans un seul cas, la septicémie fut polymicrobienne : on trouva, associés aux streptocoques, des colibacilles, des *pasteurella*, etc.

Même la péritonite puruleuse et les petits abcès rencontrés dans les organes d'un cobaye non icterique, mort à la suite de septicémie streptococcique seize jours après l'injection du virus, étaient déterminés par des streptocoques.

A l'ultra, les spirochètes furent décelés en grande quantité dans le foie. On ne les trouva pas chez un cobaye non icterique, mort de septicémie à streptocoques seize jours après l'inoculation de virus.

Il semble donc que *Sp. icterohæmorragiæ* déchaîna chez les cobayes des infections générales à streptocoques, d'une manière encore plus régulière que *Lp. icteroides*.

Deux cobayes seulement (de 180 grammes environ chacun) survécurent, après avoir présenté, pendant une vingtaine de jours, des variations fébriles entre 38°5 et 40°. Leur poids, nonobstant la fièvre, alla toujours en augmentant jusqu'à 320 grammes pour le premier et 395 grammes pour le second. Évidemment, ces deux animaux avaient échappé au sort commun, parce que, pendant la fièvre, aucun microbe de sortie n'avait fait son apparition.

B. — INFECTIONS PAR *Sp. autumnalis*.

Au sujet de ce spirochétidé, nous n'avons trouvé dans la littérature aucun travail visant des recherches microbiologiques.

On sait seulement que l'infection produite chez le cobaye par ce spirochète détermine des manifestations hémorragiques plus accentuées que celles provoquées par *Sp. icterohæmorragiæ* (1). Cela est contraire à ce que l'on constate dans la fièvre d'automne du Japon, où il n'y a ni hémorragies, ni exanthèmes.

1^o EXPÉRIENCES CHEZ LES COBAYES. — Généralement, nous avons utilisé des cobayes de 130-180 grammes.

L'infection obtenue par inoculation péritonéale (1 cent. cube de culture jeune) détermine avant tout la fièvre, entre 39° et 40°; celle-ci, dans les cas aigus, dure jusqu'à la veille de la

(1) STÉFANOUPOU et HOSOYA. *Loc. cit.*, p. 1318.

mort, qui survient au bout de cinq à huit jours dans les cas rapides ; au bout de onze à vingt-six jours dans les cas dont le cours est plus lent.

Le poids n'est pas influencé par la fièvre et, en général, il continue à s'accroître, diminuant seulement un peu la veille de la mort. Ordinairement, le poids de l'animal mort est supérieur au poids initial du même animal vivant.

Dans le cas aussi de *S. autumnalis*, il semble que ce germe ne produise pas de substances toxiques capables d'exercer une influence quelconque sur la nutrition générale.

Dans les cas aigus on constate le tableau anatomique suivant : ictere plus ou moins accentué ; suffusions hémorragiques dans les ganglions inguinaux et dans les gouttières lombaires ; parfois, exsudat hémorragique dans le péritoine ; pétéchies et infiltrations hémorragiques dans les poumons ; foie généralement pâle et exsangue ; rate parfois grossie ; urine le plus souvent icérique et albumineuse. Par l'examen à l'ultra on constate des spirochètes concentrés dans le foie et, dans certains cas, en quantité tellement massive qu'ils constituent de vrais feutrages. Cependant, leur recherche reste parfois complètement négative dans tous les organes.

Par les cultures, on décèle constamment des microbes de sortie et toujours les mêmes : streptocoques, staphylocoques, paratyphiques et tétrades, surtout dans le foie, la rate et le péritoine. Nous avons observé que, lorsque l'infection de sortie est polymicrobienne, constituée, par exemple, par des staphylocoques et des paratyphiques, les lésions anatomiques sont beaucoup plus graves. Il semble donc que la collaboration simultanée de diverses espèces microbiennes détermine une exaltation synergique de leur pouvoir toxique.

Cela ne constitue pas une nouveauté. Nous en connaissons un précédent dans la strepto-diphtherie.

Plus intéressants encore sont les cas subaigus. Ceux-ci se manifestent en général quand la dose du virus inoculé est faible (par exemple 0,5 cent. cube) et quand l'animal dépasse le poids de 200 grammes. Dans ces cas, la fièvre persiste plus longtemps que dans les cas aigus : sept, huit et même jusqu'à quatorze et seize jours, et l'ictère n'apparaît pas. Si la mort survient au bout de dix à douze jours, les lésions anatomiques

sont à peu près analogues à celles des cas aigus, mais si elle survient plus tard, au bout de seize à vingt-six jours, on relève la présence d'un grand nombre de petits abcès miliaires, localisés surtout dans le foie et la rate. Dans les gouttières lombaires on observe parfois une arborisation noirâtre, résidu d'anciennes hémorragies. Dans tous les cas subaigus, le tableau est toujours celui d'une septicémie à streptocoques ou à *pasteurella*. Les infections mixtes sont rares. Les petits abcès ou nodules nécrotiques, provoqués par les streptocoques, finissent, avec le temps, par affaiblir toute résistance de l'organisme et provoquent la septicémie.

Un de ces cas, très intéressant, mérite d'être mentionné :

Deux cobayes, du poids respectif de 165 et 170 grammes sont inoculés dans le péritoine avec 1 cent. cube de culture en Kaneko.

Chez le premier cobaye, la fièvre apparaît au quatrième jour, persiste sept jours et puis la température redevient normale. Le poids du corps augmente, néanmoins, progressivement; au douzième jour il était de 190 grammes. Au bout de quinze jours, il avait atteint 360 grammes. L'animal survécut.

Chez le deuxième cobaye, la fièvre dure du quatrième au huitième jour après l'inoculation. On a ensuite une apyraxie de vingt-quatre heures. Le lendemain, la fièvre reprend et persiste jusqu'à la mort, qui survient vingt-quatre jours après l'inoculation du virus. Le poids avait augmenté d'abord progressivement, subissant un écroulement au huitième jour, puis augmenté de nouveau, lentement, pour s'écrouler encore, brusquement, deux jours avant la mort.

A l'autopsie, on trouve les poumons, le foie, la rate et les reins parsemés de petits nodules résistants, blanc grisâtres, pleins de bacilles, qui furent identifiés plus tard comme ceux de la pseudo-tuberculose des rongeurs. Du rein on isola même un *B. proteus*.

Probablement, on peut interpréter ce cas de la façon suivante : le deuxième cobaye aurait peut-être survécu comme son compagnon, si l'infection de sortie n'avait pas fait son apparition. L'écroulement brusque et transitoire du poids du corps et la rémission fébrile du huitième jour, font supposer que, précisément dans cette journée, s'est produite l'infection de sortie.

Mais la sortie microbienne, dans un organisme sensibilisé, se traduit par un choc, qui est à son tour caractérisé par de l'hypothermie. Dans le cas du deuxième cobaye, les microbes de la pseudo-tuberculose — qui, d'après certains auteurs, appartiennent au groupe des paratyphiques — au lieu de provoquer une crise anaphylactique mortelle ou une septicémie, s'étaient

localisés et avaient déterminé une affection chronique, suivie plus tard de mort. Celle-ci fut, peut-être, hâtée par l'apparition du *B. proteus*.

Ce cas expérimental rappelle les rémissions typiques qui s'observent dans la maladie de Weil et dans la fièvre jaune.

Dans la fièvre jaune, la rémission sépare les deux paroxysmes fébriles, savoir la période dite inflammatoire de la période dite ataxo-adynamique. On sait que cette rémission, que l'on ne doit pas confondre avec la chute définitive et vraiment critique de la pyrexie, n'est que le signe d'un état de collapsus très grave qui, dans la plupart des cas, précède de peu de temps la mort. Il ne s'agit pas d'une crise favorable, signe de détente de l'infection, mais d'une crise néfaste !

Cette apparence de rémission — dit Corre (1) — est très insidieuse. Elle se transforme en dépression rapide, à laquelle suit un état adynamique brusque et fatal, précédé par la chute du pouls, des vomissements persistants, du délire, du coma.

Nos expériences démontrent clairement quelle est la cause de ces fausses rémissions. Elles sont produites par la brusque entrée sur la scène de microbes de sortie et par l'ictus anaphylactique.

On sait que H. Pfeiffer (2) mesure la gravité de cet ictus par la baisse de la température.

Les jeunes cobayes inoculés avec des cultures de *Sp. autumnalis*, survécurent moins fréquemment que ceux inoculés avec les autres spirochétidés pathogènes.

Même chez les cobayes infectés par *Sp. autumnalis*, la saignée favorise énormément les infections de sortie et la mort.

2^e EXPÉRIENCES CHEZ LES LAPINS. — On doit employer de préférence des animaux nouveau-nés, ne dépassant pas 200 à 300 grammes. Le lendemain de l'inoculation péritonéale (1 cent. cube de culture en Kaneko), se manifeste une fièvre (39°), qui peut atteindre 40-41° jusqu'à la veille de la mort. Le poids du corps augmente néanmoins, rapidement et

(1) Traité des fièvres bilieuses et typhiques des pays chauds. Paris, Doin, édit., 1883, p. 57.

(2) Über das verschiedene Verhalten der Körpertemperatur nach Injektion und nach Reinjektion von artfremdem Serum. Wien. Klin. Woch., 1909, no 1.

régulièrement, comme chez les lapins neufs, et ne subit une baisse qu'à la veille de la mort, qui survient au bout de huit à dix jours. L'ictère précède l'issue mortelle. Les lésions anatomiques sont un peu plus prononcées que chez les cobayes. On trouve des sérosités jaunâtres dans le péritoine et dans le péricarde ; quelques points hémorragiques dans l'estomac ; urine ictérique et albumineuse ; rate parfois un peu grossie ; foie hyperémié et noirâtre dans certains cas. Dans les poumons on n'observe jamais ces suffusions hémorragiques et ces pétéchies typiques représentant les signes les plus caractéristiques des cobayes qui meurent parasités par des spirochétidés.

Sous le rapport anatomique il y a, donc, une correspondance complète entre ces différentes infections expérimentales. Cela appuie l'opinion, désormais devenue générale, de l'affinité très étroite de ces espèces microbiennes.

En effet, en employant le sérum ictérique obtenu par centrifugation du sang du cœur d'un de nos lapins, mort huit jours après l'inoculation de *Lp. icteroides*, Puntoni a observé qu'il agglutinait, au même taux, soit le Leptospire de Noguchi, soit les autres spirochétidés de Inada-Ido et de Katamura-Hara.

Chez les lapins morts après inoculation de *Sp. autumnalis* le tableau bactériologique est, lui aussi, identique à celui des lapins morts par inoculation de Leptospires. Cependant, tandis que chez les cobayes on constate une septicémie à streptocoques, chez les lapins on trouve une colibacillose.

La recherche des spirochétidés est en général positive, surtout dans le foie qui, même chez les lapins, représente l'organe le plus intensivement envahi.

Dans le but de surprendre le moment des premières irrigations microbiennes chez les lapins infectés par les spirochètes, nous avons sacrifié quelques-uns de ces animaux avant l'apparition de l'ictère ou à ses premières manifestations extérieures. Quelquefois nous avons réussi à trouver le sang et les organes tout à fait stériles ; d'autres fois nous avons surpris l'infection de sortie à son début, avec la constatation de rares microbes dans le foie et dans les reins.

Nous avons dit qu'il faut employer dans ces expériences des lapins qui ne dépassent pas 200 à 300 grammes en poids. Mais un de nos lapins, qui pesait 480 grammes a succombé, icté-

rique, à la suite de l'inoculation de 1 cent. cube seulement de culture dans le péritoine.

Nous avons appris à vaincre la résistance naturelle des lapins plus âgés au moyen d'injections subintrantes.

Les lapins dont le poids dépasse 400 grammes supportent bien, pendant plusieurs jours, sans diminuer en poids, même des injections quotidiennes de spirochètes.

En voici un exemple :

Lapin (n° 93), de 430 grammes, reçoit (21 juin) en injection péritonéale 1 cent cube de virus. L'injection est répétée ensuite tous les jours. L'allure du poids et de la température est la suivante :

	POIDS	TEMPÉRATURE en degrés	
		Matin	Soir
21 juin. Injection péritonéale de 1 cent. cube de virus	430	38,7	38,4
22 juin. Injection péritonéale de 1 cent. cube de virus	440	38,6	39
23 juin. Injection péritonéale de 1 cent. cube de virus	460	38,9	39,5
24 juin. Injection péritonéale de 1 cent. cube de virus	480	39,8	40
25 juin. Injection péritonéale de 1 cent. cube de virus	485	39,5	40
26 juin. Injection péritonéale de 1 cent. cube de virus	510	39,2	39
27 juin. Injection péritonéale de 1 cent. cube de virus	540	39,5	40
28 juin. Injection péritonéale de 1 cent. cube de virus. Manifestation de l'ictère.	540	39,7	39,8
29 juin. Mort (après huit jours de maladie)	—	—	—

Tableau anatomique : ictère intense et général, liquide d'une couleur orangée dans le péritoine, foie jaunâtre, rate grossie, intestin teint en jaune, poumons un peu congestionnés, vessie contractée et vide. Spirochètes dans le sang et dans le foie. Les cultures révèlent une septicémie coibacillaire.

Il semble donc que l'organisme du lapin résiste très bien aux doses, même multiples, du virus, qui provoque seulement de la fièvre. Les doses multiples du virus ne sont pas capables d'abréger d'une façon quelconque la durée habituelle du processus spirochétosique, ni d'exercer quelque influence sur la nutrition générale, c'est-à-dire sur le poids. Cela signifie donc que les spirochétidés n'élaborent pas et ne déversent pas dans la

circulation sanguine des quantités sensibles de produits toxiques.

On peut donc supposer que dans quelques organes, par exemple dans le foie, ils provoquent par leur présence des troubles seulement fonctionnels et locaux.

Aussitôt que l'insuffisance hépatique, produite par l'action de contact des parasites, a atteint un certain degré, a lieu l'écrasement des défenses locales et les infections de sortie sont rendues possibles. Ce sont ces dernières qui provoquent les crises terminales que nous pourrions très bien nommer « crises néfastes » pour les distinguer des crises « bienfaisantes » que l'on observe généralement dans les processus infectieux aigus.

Nous avons fait des expériences sur les jeunes chiens, qui, cependant, se sont montrés assez résistants à l'action de *Sp. autumnalis*. Ce fait nous a paru d'autant plus étrange, que, de l'ensemble de nos observations, il semble ressortir que *Sp. autumnalis* exerce une action plus marquée — au moins chez les cobayes et les lapins — que *Sp. icterohæmorragiae*.

III. — Différences histo-pathologiques entre les infections par *Leptospires* seuls et les infections à crises terminales « néfastes ».

1^e TABLEAU HISTO-PATHOLOGIQUE DES INFECTIONS PAR *Sp. icteroides* CHEZ LES COBAYES.

A quoi doit-on attribuer, chez l'homme et chez les animaux infectés par des spirochétidés, cette réceptivité fatale vis-à-vis des infections microbiennes de sortie?

Dans aucune autre maladie infectieuse on n'a signalé un phénomène si accentué et si constant.

Cela signifie que, dans les spirochétoses, ont lieu des changements profonds et spéciaux, de nature humorale, qui sont singulièrement favorables au rappel et à l'implantation de microbes étrangers.

Nous avons essayé d'expliquer, chez les cobayes spirochétisés, les causes de cette anergie, laquelle se manifeste lors de la première rémission ou au début de l'apyréxie définitive.

D'abord nous avons pensé à une modification du pouvoir

bactéricide du sang. Mais des recherches à ce sujet ne nous ont pas donné de résultats concluants. En employant comme microbe d'essai le *B. typhique* et en procédant à la numération des colonies sur plaques de gélose, nous avons trouvé que, vis-à-vis de ce microbe, les sérum ictériques de cobayes se comportent à peu près comme des sérum normaux. Bien plus, en ensemençant le *B. typhique* dans les deux sortes de sérum et en le cultivant à 37°, on observe que, dans le sérum normal, il se développe mieux que dans le sérum ictérique!

Des essais analogues ont été faits avec le streptocoque, mais ont donné eux aussi des résultats peu concluants.

En somme, l'étude de la bactéricidie n'apporte pas l'explication de la tendance particulière que l'on constate chez les animaux spirochétisés à subir les invasions microbiennes de sortie.

D'ailleurs, si les résultats avaient même été différents, ils n'auraient pas éclairci tous les points obscurs du problème. Par exemple, nous avons déjà dit que les plus graves altérations anatomiques chez les cobayes qui succombent aux processus aigus ou subaigus, ne coïncident pas toujours avec le tableau bactériologique le plus grave, c'est-à-dire septicémique. Nous avons, en outre, remarqué les difficultés que l'on éprouve parfois dans le dépistage de certains microbes de sortie, quand leur nombre est faible et que leur localisation précise n'est pas indiquée, à l'autopsie, par quelques signes évidents. Cela amène à supposer que, dans l'organisme d'un animal infecté par le Leptospire et sensibilisé par ce même microbe, il peut se produire une réaction grave et mortelle par suite de l'intervention de bactéries, même en petit nombre, non virulentes et de nature banale.

Pour essayer d'apporter quelque lumière dans ce problème, si enchevêtré, nous avons décidé d'en poursuivre l'étude même au point de vue histologique.

Le premier qui ait décrit les altérations microscopiques des divers organes dans l'infection expérimentale par Leptospire chez les cobayes, a été Noguchi. Ses observations, cependant, sont quelque peu sommaires et peuvent se résumer comme suit (1) :

(1) Transmission experiments on Yellow fever. Symptomatology and pathological findings in animal experimentally infected. *The Journ. of Exper. med.*, 1919, p. 585.

Poumons: foyers hémorragiques nombreux et étendus, avec les alvéoles gorgés de sang. Oœdème des tissus environnants.

Foie: tuméfaction et nécrose de la plupart des cellules hépatiques, dont les noyaux sont tuméfiés et dégénérés. Dans quelques zones, les cellules sont dissociées et quelques-unes d'entre elles présentent des vacuoles. Les cellules voisines des vaisseaux sanguins paraissent moins frappées que celles situées autour des branches de la porte. Zones hémorragiques distribuées irrégulièrement.

Reins: épithélium des tubuli granuleux, tuméfié, parfois avec vacuoles; cylindres granuleux et hyalins; glomérules fortement injectés; hémorragies nombreuses dans les substances médullaire et corticale.

Glandes surrénales: dégénérescence parenchymateuse, congestion et hémorragies.

Estomac et intestin: muqueuse congestionnée avec zones hémorragiques.

Rate: hémorragique et gorgée de sang.

Evidemment, en se basant sur ce tableau anatomique, Noguchi a été poussé à conclure que, chez les animaux d'expérience, la mort est due aux lésions qu'il a cru causées uniquement et directement par le Leptospire (1).

D'autres auteurs, qui ont entrepris la même étude, ont abouti à des résultats qui ne confirment pas complètement ceux observés par Noguchi.

Hoffmann (2) trouve que les altérations produites par le *Lp. icteroides* sont identiques à celles produites par le *Sp. ictero-hæmorrhagiae*; il exclut l'existence de faits de dégénérescence dans les cellules hépatiques et conclut que les lésions anatomiques de la fièvre jaune sont analogues à celle de la maladie de Weil. Les altérations du foie dans les deux maladies différeraient seulement en intensité et non dans leur caractère essentiel.

Au contraire, Perez Grozas et Garcia (3) trouvent dans le foie une dégénérescence graisseuse de tous les éléments cellulaires. Labredo (4) n'a trouvé ni les dégénérescences, ni les hémorragies que l'on observe chez l'homme; Guiteras (5) affirme que les lésions produites par *Lp. icteroides* sont très différentes de celles de la fièvre jaune humaine et, au contraire, sont identiques

(1) Yellow fever research 1918-1924. *Journ. of Trop. Med. a. Hyg.*, 15 mars 1925.

(2) The histopathology of yellow fever. *The Journ. of Trop. Med. a. Hyg.*, 1924, p. 235.

(3) Experimental transmission of Yellow fever. *The Journ. of the Americ. med. Assoc.*, 1921, p. 352.

(4) Leptospiralosis experimental, etc. *Revista de Med. y. Cir. Habana*, 25 septembre 1921.

(5) Expedición al Africa y estudios de fiebre amarilla. *Ibid.*, 10 mars 1921.

à celles de l'ictère infectieux. Aussi Snijders (1) confirme le même fait, en affirmant qu'il n'est pas possible de différencier au point de vue anatomo-pathologique expérimental, la fièvre jaune de la maladie de Weil. Perrin observe, au contraire (2), dans le foie des cobayes, des phénomènes congestifs et hémorragiques intenses, de la dégénérescence graisseuse et des îlots de nécrose. Müller (3) confirme simplement les vues de Noguchi.

En somme, beaucoup de contradictions; aucune idée bien précise!

En entreprenant de notre côté l'étude de la question au point de vue histologique, nous avons voulu séparer nettement les cas d'infections spirochétiques, qui ont abouti à des infections de sortie, de ceux représentés par des infections pures, c'est à-dire provoquées par les seuls spirochétidés. Nous avons fait cette séparation de cas, soupçonnant déjà la cause probable des contradictions qui existaient parmi les auteurs mentionnés plus haut.

Nous avons donc étudié: 1^o les organes de cobayes *morts* ictériques avec de graves lésions anatomiques et avec un tableau bactériologique du type septicémique (à streptocoques); 2^o les organes de cobayes *morts* ictériques avec de graves lésions anatomiques et un tableau bactériologique caractérisé par la présence de très rares microbes de sortie; 3^o les organes de cobayes *sacrifiés* en série, du quatrième au dixième jour de l'infection spirochétique, quelques-uns avec des manifestations déjà initiales d'ictère, mais trouvés à l'autopsie exempts d'infections de sortie.

Le tableau suivant de comparaison permettra de relever facilement les remarquables différences qui existent entre les organes de cobayes qui ont subi l'invasion des seuls Leptospires et les organes de cobayes qui, postérieurement, ont subi, d'une façon massive ou discrète, directe ou indirecte, des invasions de microbes de sortie.

(1) Zur pathologischen Anatomie der Leber bei Gelbfieber und Weilscher Krankheit. *Nocht. Zeitschr.*, in *Arch. f. Seh. u. Trop. Hyg.*, 28, 1921, p. 539.

(2) The hepatic lesions of experimental yellow fever. *The Amer. Journ. of Trop. Medicine*, 1^{er} janvier 1923.

(3) Histopathology and hematology of experimental yellow fever. *Proc. Internat. Conf. Problem in tropical America*, 22 juillet 1924.

ALTÉRATIONS PRODUITES DANS LES ORGANES DES COBAVES

par « *Lp. icterooides* » seuls.

Poumons: congestion légère de l'organe; hémorragies parsemées irrégulièrement, qui ne dépassent jamais en étendue 4 à 8 alvéoles et ne tendent pas à la confluence. La structure du poumon et la continuité des parois alvéolaires sont parfaitement conservées. Si l'on excepte les points hémorragiques, l'organe présente ses alvéoles complètement libres.

par « *Lp. icterooides* » et microbes de sortie.

Poumons: tous les vaisseaux pulmonaires, sans exception, sont fortement congestionnés. Extravasions sanguines remarquables dans les espaces inter-alvéolaires et à l'intérieur des alvéoles, avec désorganisation des rapports histologiques. Les hémorragies comprennent même 2 à 3 champs microscopiques et à leur intérieur on observe une intense réaction leucocytaire. On constate aussi un processus de réaction dans les petites bronches, qui contiennent des hématies, de la fibrine et des cellules épithéliales détachées et dégénérées.

Foie: structure bien conservée; aucune trace d'extravasations sanguines; parfois tuméfaction trouble des cellules hépatiques, due à un certain degré de stase sanguine et à la fièvre; voies biliaires libres; quelques cellules présentent des vacuoles, mais la coloration par l'« Eearlate R » ne révèle aucune dégénérescence graisseuse. Dans le foie d'un seul cobaye on a observé des zones presque incolores, situées en général à la périphérie du lobule hépatique, près d'un espace de Kiernan et dans lesquelles les cellules hépatiques avaient perdu leur structure et présentaient leur protoplasme avec quelques vacuoles. On supposa qu'il s'agissait de cellules parasitées par les *Lep'ospires*.

Foie: distension générale des vaisseaux sanguins; effractions vasales et hémorragies intercellulaires consécutives, avec destruction de tous les rapports de contiguïté et de continuité entre les cellules hépatiques, qui se présentent dérangées, isolées et entourées d'hématies et comme nageant dans le sang extravasé. Cellules hépatiques augmentées de volume et granuleuses. Quantité de foyers de nécrose, constitués par des cellules hépatiques dégénérées, nécrosées et incolores, par des amas de substance albuminoïde et par un résidu d'éléments cellulaires détruits. Ces endroits, atteints de nécrose, sont disposés en îlots et entourés d'une zone de réaction, dans laquelle on observe des éléments en caryocinèse. Dans les coupes colorées avec érythrosine orange et bleu de toluidine, on observe des streptocoques parsemés dans toute la zone de nécrose, plus nombreux, cependant, au centre. Même là où la nécrose n'a pas encore exercé son œuvre de destruction, on décèle des streptocoques en chaînettes le long

REINS: fréquente congestion vasculaire, avec de petites zones (100-150 µ) intensément injectées, situées entre la substance corticale et la médullaire, à la base de quelques pyramides de Ferrein. Glomérules normaux. La lésion essentielle du rein est représentée par une tuméfaction trouble des cellules des tubes contournés de premier et de second ordre et de la branche ascendante de Henle. Les cellules tombent en fragments, avec leur noyau, dans la cavité des tubes. Aucune dégénérescence graisseuse. Ces lésions se trouvent en rapport direct avec l'emplacement des *Leptospires* dans le parenchyme. Aucun cylindre, ni épithelial, ni hématique. Les parties excrétrices du rein contiennent parfois de simples amas de détritus cellulaires.

GLANDES SURRENALES: parfois une congestion à peine marquée et exclusivement bornée à la substance médullaire.

des capillaires et presque adhérents à l'endothélium.

REINS: contraste de couleur entre les deux substances : corticale et médullaire; vaisseaux de la substance corticale gorgés de sang et tubes contournés intensément colorés. Substance médullaire pâle ; la différence de coloration est en rapport avec le siège et l'intensité des lésions; fortement frappés sont les tubes contournés, la branche ascendante de Henle et la portion de Schweiger-Seidel. Cellules de la cavité des tubes en proie à la tuméfaction trouble et à la dissolution granuleuse, souvent nécrosées, détachées de la membrane basale et tombées dans la cavité. Aucune dégénérescence graisseuse; plusieurs phénomènes de caryocinèse. Outre les cellules tombées, on trouve dans la cavité des tubes des hématies et des polynucléaires. Dans les tubes droits et dans ceux collecteurs, on observe de vrais cylindres épithéliaux, hématiques et mixtes. Glomérules fortement congestionnés, avec des anses gorgées de sang et qui distendent la capsule de Bowmann. Celle-ci contient souvent un exsudat albumineux, finement granuleux, avec des globules rouges et des leucocytes; son épithélium capsulaire est desquamé et tuméfié par endroit. Hémorragies des tubes causées par les vaisseaux péritubulaires. Le tissu conjonctif péritubulaire montre aussi une intense réaction leucocytaire. On est, en somme, en présence d'une néphrite hémorragique.

GLANDES SURRENALES: toujours et fortement frappées par des épanchements hémorragiques dans la substance médullaire. Le sang, en se frayant le chemin du centre vers la périphérie de la glande, bouleverse la structure du parenchyme de la zone fasciculée et réticulée. Hémorragies sous-capsulaires, semblables à de vrais hématomes et qui éloignent l'un de l'autre les faisceaux de la zone corticale. Parfois, la glande se

TUBE DIGESTIF: en général, normal.

trouve transformée en un *lac de sang*. Dans ces cas, sa structure normale n'existe plus. Elle est représentée par un mince réseau conjonctif, déchiré en plusieurs points et dans les mailles duquel, au milieu du sang, on rencontre des cellules et des colonnes cellulaires de la zone médullaire, dans des états divers de dégénérescence.

TUBE DIGESTIF: hémorragies abondantes dans la muqueuse. Pétéchies généralement représentées par des capillaires dilatés à cause de la résistance amoindrie des parois. Dans quelques endroits, la pression endo-capillaire détermine l'effraction complète des vaisseaux eux-mêmes et le sang qui se déverse altère profondément la structure de la muqueuse. Dans les zones hémorragiques on observe la chute de la partie superficielle de la muqueuse. On trouve des hémorragies même dans la sous-muqueuse, la *muscularis mucosæ*, et aussi dans l'épaisseur de la couche musculaire. Infiltration leucocytaire marquée dans la sous-muqueuse. Plaques de Peyer remarquablement grossies.

RATE: follicules malpighiens augmentés de volume; vaisseaux sanguins parfois exsangues, parfois congestionnés; mailles du réticulum de la pulpe riches de sang.

RATE: follicules de Malpighi tout à fait normaux. Dans les mailles de la pulpe, une certaine quantité de globules rouges, parfois contenus dans des cellules.

Par la simple lecture de ces deux tableaux histo-pathologiques, on relève facilement que les graves lésions décrites et dessinées par Noguchi et confirmées par d'autres auteurs comme pathognomoniques des infections spécifiques par *Lp. icteroïdes*, ne correspondent point à celles que ces Leptospires seuls sont capables de produire. Évidemment ces auteurs ont vu et décrit des lésions que l'on trouve seulement chez les cobayes morts à la suite d'infections septicémiques de sortie.

Ils avaient peut-être pensé choisir pour leurs études microscopiques les cas les plus graves, en les considérant comme bien démonstratifs et, au contraire, ils ont porté leur attention

sur des cas dont la gravité était simplement due à l'intervention de microbes de sortie. Cela est aussi confirmé par les résultats de notre étude histo-pathologique sur le foie de cobayes morts avec le tableau typique de l'ictère grave à Leptospires. Nous avons, en effet, trouvé dans cet organe des nodules de nécrose, ayant l'aspect d'ilots, formés par des détritus cellulaires et nucléaires.

Grâce à un procédé de coloration convenable, nous avons réussi à démontrer, à l'intérieur de ces îlots, de grands amas de streptocoques, comme on le voit dans les figures 2 et 3 (pl. I) qui accompagnent ce mémoire.

Il s'agit donc de simples foyers microbiens, n'ayant aucune signification spécifique et dus à l'action directe et locale de streptocoques de sortie.

Or, ces foyers correspondent probablement aux « nécroses insulaires » et aux amas nécrotiques décrits et dessinés dans l'ouvrage de Martin et Pettit (1), comme lésions hépatiques caractéristiques chez les cobayes morts de spirochétose ictero-hémorragique.

Mais, il s'agit peut-être de lésions anatomiques de même nature. Cela plaide en faveur de l'identité des processus morbides expérimentaux provoqués, à Paris ou à Rome, par les deux spirochétidés.

Un fait analogue semble s'être produit à propos de l'examen du foie de cadavres de jauneux et de cobayes morts d'infection à Leptospires.

Noguchi et Pareja (2) ont insisté beaucoup, d'après leurs études effectuées en 1918 à Guayaquil, sur l'abondance de certains « endroits nécrotiques » rencontrés dans le foie. Au contraire, Perez Grovas (3), d'après des recherches analogues faites à Vera-Cruz en 1920, nie la fréquence de ces « lésions nécrotiques ». On doit donc conclure que la fréquence plus ou moins marquée de ces foyers nécrotiques dans le foie, relève de la dissémination plus ou moins grande des foyers formés dans l'organe par des microbes de sortie : streptocoques, paratyphiques, etc.

Mais on a constaté encore, si l'on veut même faire abstrac-

(1) Spirochétose ictero-hémorragique. Paris, Masson, 1919, p. 441.

(2) Transmission Experiments on Yellow fever. *The Journ. of Exper. med.*, 1919, p. 547.

(3) Experimental transmission of Yellow fever. *The Journ. of Exper. med.*, 5 février 1921, p. 362.

tion de ces lésions en foyers, qu'à l'égard de l'intensité des altérations anatomo-pathologiques rencontrées à l'autopsie, ne ressort aucune différence entre les cobayes qui meurent avec le tableau bactériologique d'une septicémie, et ceux chez lesquels les microbes de sortie paraissent en petit nombre, ou localisés seulement dans quelques organes. On est donc amené, dans ces cas, à attribuer les graves désordres anatomiques décrits, et qui relèvent évidemment et directement de ce que nous avons appelé la « crise néfaste », au déchaînement d'un choc de nature anaphylactique, plutôt qu'à l'action propre et directe des microbes.

Les caractères de toutes les altérations microscopiques que nous avons décrites tout à l'heure démontrent leur nature anaphylactique.

Les congestions viscérales intenses, accompagnées parfois de graves et soudaines hémorragies dans les cavités séreuses, surtout dans le péritoine; les hémorragies parenchymateuses qui surviennent soudainement par l'hyperdilatation et l'effraction des capillaires viscéraux, dont les parois sont évidemment frappées par des processus de dégénérescence extrêmement rapides; les troubles organiques des régions tissulaires, surtout les hémorragies rénales typiques, inter-tubulaires et intra-gombrulaires; les hémorragies inter-épithéliales de la muqueuse digestive, les épistaxis, la destruction parfois de vastes zones parenchymateuses, etc., donnent vraiment l'image d'un cataclysme anaphylactique.

Les préparations microscopiques de quelques organes, particulièrement des reins et de l'appareil digestif, reproduisent des aspects tout à fait semblables aux planches en couleurs qui accompagnent les travaux les plus connus sur l'anaphylaxie, par exemple celui de A. Lumière (1).

2^e DISTRIBUTION DE *Lp. icteroides* DANS LES DIFFÉRENTS ORGANES DU COBAYE.

Cette conception est, en outre, appuyée par l'étude que nous avons faite sur la distribution des Leptospires dans les organes de cobayes parasités par les seuls Leptospires, aussi bien que

(1) Le problème de l'anaphylaxie. Paris, Doin, 1924.

de cobayes morts à la suite de la crise anaphylactique déchaînée par les infections de sortie.

Nous avons étudié cette distribution sur les coupes histologiques, en employant la méthode de nitratation de Manouélian, laquelle rend possible les colorations de contraste par le rouge neutre-bleu de méthylène.

En ce qui concerne les aspects des Leptospires dans les coupes, nous remarquons seulement qu'ils sont tout à fait semblables à ceux des spirochètes icterogènes, décrits avec beaucoup de précision par Monti (1) et par Martin et Pettit (2).

Les organes du cobaye envahis par le plus grand nombre de Leptospires sont généralement : le foie, les glandes surrénales et les reins.

Cependant, il faut dire tout de suite que les altérations histo-pathologiques des divers organes ne signifient pas toujours que les Leptospires se trouvent en proportion correspondante à la gravité des altérations elles-mêmes.

Par exemple : dans les glandes surrénales, la distribution des Leptospires est quelque peu irrégulière. Relativement peu nombreux dans les zones baignées par les capillaires, ils se trouvent groupés, parfois, en buissons ténus, dans les interstices cellulaires de la substance médullaire (fig. 6, pl. II). Dans les glandes surrénales de cobayes morts à la suite d'infection de sortie, les infiltrations hémorragiques, parfois très étendues, contiennent seulement un tout petit nombre de Leptospires. Cette quantité minime contraste fortement avec l'intensité du bouleversement parenchymateux, qui a produit la désagrégation complète de l'organe.

Ces graves altérations des glandes surrénales — tout à fait identiques à celles décrites par Monti (3) dans l'ictère expérimental à *Sp. icterohæmorragiae* — expliquent sans plus l'apparition de ce syndrome clinique caractérisé par une asthénie intense, la pigmentation de la peau et des muqueuses, de la lymphocytose avec absence ou insuffisance de réactions adrénaliennes, etc., c'est-à-dire caractérisé par des faits d'hyposur-

(1) Ouvrage cité.

(2) Ouvrage cité.

(3) Ouvrage cité, p. 57.

rénalisme, que Frugoni et Gardenghi (1) ont décrits avec précision chez les malades et les convalescents d'ictère épidémique.

Dans les reins, les Leptospires sont, au contraire, très nombreux. Leur disposition est indiquée par la figure 7 (pl. II). Ils sont surtout présents dans les vaisseaux sanguins péri-tubulaires, d'où ils émigrent pour atteindre d'abord les espaces libres autour des tubes et, ensuite, envahir les parois des tubes eux-mêmes. Ils passent à travers la membrane basale et, se frayant le chemin entre les cellules, se déversent dans la cavité des tubes. Les coupes de rein les plus peuplées par les Leptospires sont les tubes contournés, à l'exception de la branche ascendante de Henle et de la portion de Schweiger-Seidel. Parfois, les Leptospires forment un enchevêtrement très touffu.

Dans le foie le nombre des Leptospires est, peut-être, encore plus grand que dans le rein. Ils occupent, en général, les espaces intercellulaires et se trouvent en plus grande quantité à la périphérie des lobules et près de la veine centrale. Les Leptospires sont disséminés sur toute la surface du lobule, tandis qu'ils sont très rares dans les espaces de Kiernan et le long des vaisseaux principaux. Dès le début de leur invasion hépatique ils tendent à se placer autour des éléments propres de l'organe formant un réseau délicat enserrant, ainsi, chaque cellule dans une couche dense de parasites. Dans le foie de cobayes morts à la suite d'infection de sorbie, et, par conséquent, ayant des lobules hépatiques profondément bouleversés dans leurs structures et parsemés de petits foyers hémorragiques, les Leptospires forment, dans les lacs de sang, des enchevêtrements très denses, comme s'ils avaient subi une agglutination. Dans ces cas, les Leptospires sont rares. Dans la figure 8 (pl. II) on voit ces enchevêtrements là où l'on remarque le début d'une hémorragie interstitielle.

Les parois du tube digestif sont un peu moins envahies par les Leptospires. Toutefois, on peut assez souvent remarquer la présence de ces parasites dans les parois de l'estomac, dans les anses capillaires de la muqueuse, de la sous-muqueuse et de la couche musculaire. Dans les zones hémorragiques et près des

(1) Studi sull' ictero epidemico castrense. *La Sperimentale*, 1916, p. 639.

pétéchies on les voit souvent groupés en petits enchevêtements.

Même dans la paroi intestinale ils se trouvent, en général, dans les capillaires, dans le chylifère central de la villosité, dans le tissu conjonctif de soutien et aussi dans le tissu conjonctif sous-épithérial.

Ces constatations aident à résoudre le problème, resté jusqu'aujourd'hui insoluble (1), de l'élimination intestinale des spirochétidés. Évidemment, les spirochétidés que l'on décèle dans la sous-muqueuse et dans les villosités de l'appareil digestif, sont surpris au moment où ils sont sur le point d'être éliminés par la voie gastro-intestinale. On sait que la muqueuse digestive représente un des principaux émonctoires microbiens. L'un de nous a démontré cela à l'égard des vibrios cholériques (2). Dans les spirochétoses, les troubles gastriques, les vomissements, la diarrhée abondante et les autres faits de réaction du côté de l'appareil digestif sont dus — comme dans le choléra — à l'invasion pariétale, par voie sanguine, des parasites et aux suites directes ou indirectes qui relèvent de leur présence dans les tuniques intestinales, qui, à leur tour, sont très sensibles à toute irritation de nature microbienne.

Résumé.

Des expériences décrites dans ce second mémoire, on peut tirer les conclusions suivantes :

1^o Chez les cobayes parasités par des Leptospires, il peut y avoir pullulation et multiplication, pendant longtemps, de ces microbes, sans que l'état général de santé des animaux, soit sensiblement altéré. En effet, les Leptospires ne semblent pas capables de produire, seuls, de graves altérations anatomiques. Les cobayes peuvent supporter impunément la prolifération des Leptospires et même, l'injection de doses répétées et massives de ces microbes, pourvu qu'il ne se manifeste pas d'infections de sortie. Ces infections, spécialement celles du colibacille, font disparaître les Leptospires de l'organisme des animaux parasités.

(1) MARTIN et PETIT, *ouv. cité*, p. 55.

(2) SANARELLI. Le gastro-entérotropisme des vibrios. *Ces Annales*, 1920.

2^o Les expériences *in vitro* révèlent, elles aussi, que les spirochétidés sont en général doués d'une faible résistance vitale vis-à-vis de la concurrence et de l'antagonisme exercés envers eux par divers microbes.

3^o Les microbes de sortie, que l'on isole des animaux infectés par des spirochétidés, ne se montrent pas doués d'une virulence qui justifie la gravité du tableau anatomique que l'on constate ordinairement à l'autopsie.

4^o Vis-à-vis des infections de sortie, la manière dont se comportent les animaux infectés et sensibilisés par les Leptospires est tout à fait la même que celle des animaux infectés par *Sp. icterohæmorrhagiae* et par *Sp. autumnalis*. Cela renforce l'opinion de l'affinité très grande qui existe entre ces différentes souches microbiennes.

5^o La sortie ou l'invasion de microbes au cours des spirochétoses expérimentales, a lieu d'une façon régulière dans une phase déterminée du processus morbide, savoir vers la fin du paroxysme fébrile, où peu après.

Le déclenchement et l'invasion microbienne coïncident, d'ordinaire, avec une baisse brusque de la température du corps. Cette apyrexie, au lieu d'être une rémission fébrile, n'est, souvent, que l'équivalent hypothermique d'une crise soudaine de nature anaphylactique, qui coïncide avec l'infection de sortie.

La physionomie de toutes les lésions macro et microscopiques les plus graves, que l'on constate chez les animaux qui succombent à des infections spirochétosiques, témoigne de leur nature anaphylactique.

Nous avons désigné, cette apyrexie critique sous la dénomination de « crise néfaste » pour la distinguer de la « crise bienfaisante » qui, généralement caractérise la soudaine et définitive disparition de la fièvre, dans les maladies infectieuses aiguës.

6^o Les microbes qui, ordinairement, envahissent un organisme déjà parasité par les spirochétidés, sont presque toujours les mêmes pour une même espèce animale. Les cobayes sont généralement envahis par des streptocoques, plus rarement par des paratyphiques. Chez les lapins, les microbes de sortie les plus communs, sont les colibacilles. Chez les jeunes chiens on constate des invasions polymicrobiennes. Chez l'homme on a

isolé le plus fréquemment ces souches paratyphiques, auxquelles maints auteurs ont attribué un rôle nettement spécifique.

7^o Ces infections de sortie ne surviennent pas par suite d'une diminution du pouvoir bactéricide du plasma sanguin, mais, plus spécialement par l'anéantissement de la fonction protectrice du foie qui, dans les ictères spirochétosiques, représente, avec le rein, l'organe le plus envahi et le plus endommagé par les parasites. Ceux-ci se disposent, en effet, dans le foie, d'une façon élective et forment autour des cellules hépatiques ces réseaux denses qui altèrent profondément la structure cellulaire et gênent la fonction normale de l'organe.

8^o Les différences que l'on peut observer dans l'aspect et l'intensité des altérations anatomo-pathologiques dans les ictères spirochétosiques expérimentaux, ne relèvent pas d'une différence dans la façon dont l'organisme réagit vis-à-vis des spirochétidés. L'organisme réagit dans ces cas toujours de la même manière. La diversité des tableaux anatomo-pathologiques dépend plutôt des variations dans l'action, unique ou synergique, du microbe ou des microbes de sortie, ou bien de la façon différente dont l'organisme lui-même ou les différents organes réagissent contre la décharge anaphylactique que ces microbes provoquent.

9^o Les recherches histologiques et bactériologiques démontrent que les spirochétidés seuls, quoique à même de déterminer quelques lésions caractéristiques, ne sont pas, toutefois, capables de rendre ces lésions assez graves pour causer la mort. Les altérations anatomopathologiques les plus importantes et les plus graves que l'on rencontre chez les animaux morts à la suite d'une infection spirochétosique, ne sont pas dues aux spirochétidés, mais bien à des complications produites par l'intervention de microbes de sortie.

Les lésions les plus intéressantes, décrites jusqu'à présent par les auteurs dans les spirochétoses ictérogènes expérimentales, doivent donc être attribuées à cette intervention et non aux spirochétidés seuls.

10^o Chez les animaux infectés par les spirochétidés, les microbes de sortie ne déchaînent pas toujours des crises néfastes mortelles ou des infections septicémiques. Dans quelques cas les microbes de sortie s'arrêtent et s'implantent dans

quelques organes, spécialement dans le foie, dans la rate ou dans les poumons, où ils provoquent des processus inflammatoires ou purulents.

Plus tard, ces infections localisées finissent, généralement, par provoquer la mort par cachexie ou par brusque diffusion septicémique.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I

FIG. 1. — Poumon de cobaye mort à la suite d'infection par *Lp. icteroides*, avec crise finale streptococcique.

Coupe au niveau d'une pétéchie. L'aspect du poumon est profondément modifié. Les capillaires des cloisons sont gorgés de sang. En quelques endroits, on note des amas d'hématies dans les alvéoles. Ceux-ci en résultent parfois fortement dilatés; leur parois se montrent déchirées et l'on remarque alors des infiltrations hémorragiques plus ou moins étendues. Dans les zones hémorragiques on observe quelques macrophages contenant des globules rouges. Les petites bronches montrent, elles aussi, des exfoliations épithéliales et renferment, en outre, des hématies et une quantité considérable de fibrine (coloration trichromique à différenciation phosphomolybdique, d'après Masson. Object. 5; Oc. 6).

FIG. 2. — Foie de cobaye mort ictérique au bout de sept jours, par infection à *Lp. icteroides*, avec crise finale streptococcique.

Coupe au niveau d'un foyer de nécrose. On observe de nombreux streptocoques. Cellules hépatiques dans un état de dégénérescence plus ou moins avancé. Leur noyau est fortement pycnotique. Autour du foyer quelques cellules hépatiques sont plus ou moins modifiées; d'autres sont en proie à une multiplication atypique. Toutes ces cellules se montrent comme écartées les unes des autres, par suite de l'abondante infiltration hémorragique. Les hématies, absentes au centre du foyer, se montrent plus ou moins intensément colorées (coloration à l'érythrosine-orange G et au bleu de toluidine. Object. imm. hom. 3 mm.; Oc. 6).

FIG. 3. — Foie du même cobaye.
Coupe au niveau d'un foyer de nécrose.

FIG. 4. — Rein du même cobaye.

Vue d'ensemble. Les tubes contournés, fortement colorés en rouge, constituent le siège principal des lésions. Leur cavité est obstruée par l'exfoliation épithéliale. La coloration est plus intense dans leur branche ascendante et dans les anses de Henle. Les glomérules malpighiens sont tachés de rouge et les vaisseaux sanguins de la zone corticale sont gorgés de sang (coloration trichromique de Masson. Object. 2; Oc. 4).

PLANCHE II

FIG. 5. — Estomac du même cobaye.

La figure représente une portion de la muqueuse de l'antre pylorique, avec deux phases successives de la même altération fondamentale. A gauche, on remarque les altérations des vaisseaux, dans la phase de simple

dilatation, plus accentuée vers la cavité gastrique. Pour cela, le bord de la muqueuse présente un aspect à festons.

A droite, on voit les vaisseaux capillaires de la muqueuse déchirés avec extravasation d'hématies. Celles-ci, en s'infiltrant parmi les canaux glandulaires, déterminent, d'un côté, la désorganisation de la glande, et, de l'autre côté, des altérations dans la nutrition des cellules peptogastriques. Il s'est produit, par conséquent, la chute de la couche superficielle de la muqueuse et successivement des hémorragies. On voit aussi des dilatations des vaisseaux dans la sous-muqueuse et dans la couche musculaire (*coloration trichromique de Masson. Object. 6; Oc. 6*).

FIG. 6. — *Glande surrenale* de cobaye mort icterique au bout de cinq jours, par infection à *Lp. icteroides*, avec crise finale à streptocoques. Les streptocoques étaient, cependant, localisés seulement dans le foie et dans les reins.

Coupe au niveau de la limite entre la zone corticale et la zone médullaire.

Les Leptospires sont plus nombreux dans les espaces sanguins. Un certain nombre d'entre eux se trouvent aussi dans les interstices cellulaires. Extravasations sanguines, de petite étendue, provenant des capillaires gorgés de globules rouges. Dégénérescence trouble des cellules, (*imprégnation d'après la méthode de Manouélian; coloration de contraste avec le Giemsa. Object. imm. hom.; 3 mm.; Oc. 8*).

FIG. 7. — *Rein* du même cobaye.

Coupe au niveau de la substance corticale. Leptospires extraordinairement abondants dans les espaces intertubulaires, où ils forment des amas et des enchevêtrements touffus. Dans le dessin, on voit les Leptospires à l'intérieur des capillaires qui entourent les tubes contournés. Parfois on voit quelques parasites, isolés, à l'intérieur de ces tubes où ils acquièrent un aspect plus trapu, parce qu'ils sont plus grossièrement imprégnés que ceux extratubulaires (*imprégnation selon Manouélian. Object. imm. hom. 3 mm. Oc. 8*).

FIG. 8. — *Foie* d'un cobaye mort icterique au bout de huit jours d'infection à *Lp. icteroides*, avec crise finale à streptocoques.

L'organe se montre tout à fait rembourré de Leptospires qui occupent les espaces intercellulaires et se trouvent en plus grande quantité à la périphérie des lobules et près des veineuses centrales. Ils sont rares, au contraire, dans les espaces de Kiernan et, en général, le long des gros vaisseaux. Les Leptospires se placent, en général, autour des cellules hépatiques, les emprisonnant par un dense réseau. Dans les endroits où l'on observe des extravasations sanguines et la désorganisation des travées cellulaires, on voit les Leptospires dans les lacs de sang, enchevêtrés et comme agglutinés ensemble (*imprégnation selon Manouélian. Object. imm. hom. 1/15; Oc. 6 comp.*).

PRÉPARATION DES SÉRUMS ANTIGANGRÉNEUX MONOVALENTS AVEC DES TOXINES FORMOLÉES

par M. WEINBERG et J. BAROTTE.

Au cours des recherches que l'un de nous (Weinberg), seul ou en collaboration avec P. Séguin, a poursuivi depuis le début de la guerre sur la préparation des sérumns antigangrénous, il a constaté que, dans la pratique sérothérapique, les meilleurs résultats étaient obtenus par les sérumns à la fois antitoxiques et antimicrobiens.

Pour préparer des sérumns fortement antitoxiques et antimicrobiens, il utilisa la technique suivante : on injecte, dans la même journée, et à quelques heures d'intervalle, d'abord des microbes centrifugés dans la veine, puis, sous la peau, de la toxine provenant de la centrifugation de la même culture. L'expérience a montré qu'il suffisait d'injecter sous la peau du cheval de la toxine centrifugée, c'est-à-dire renfermant encore une certaine quantité de corps microbiens, pour obtenir un sérum antitoxique et antimicrobien de titre moyen.

Les injections répétées des toxines gangréneuses épuisent à la longue les chevaux les plus résistants. C'est pourquoi, dès les remarquables travaux de Ramon sur l'anatoxine diphtérique, Weinberg, puis Weinberg et Prévot ont essayé de préparer les sérumns antigangrénous avec des toxines formolées. Ils ont pu constater l'inocuité des antigènes ainsi préparés et leur aptitude à provoquer chez le cheval la formation d'anticorps spécifiques. Mais ils ont également remarqué que le formol n'agit pas sur les toxines gangréneuses de la même façon que sur la toxine diphtérique : s'il est possible de préparer avec les toxines formolées, des sérumns anti-*perfringens* et anti-*œdematiens* de titre aussi élevé qu'avec la toxine non formolée, il n'en est pas de même pour les sérumns anti-Vibron

septique et anti-histolytique, toujours moins actifs que ceux préparés par la toxine non formolée.

D'ailleurs, il fût impossible, aux mêmes auteurs, de titrer, *in vitro*, le pouvoir antitoxique des sérum-s antigelanténeux par la méthode de la flocculation initiale (Ramon).

Nous avons décidé de reprendre ces recherches avec la toxine formolée, pour voir si les résultats obtenus dans la préparation des sérum-s anti-Vibron septique et anti-histolytique n'étaient pas dus au hasard de la réaction individuelle des animaux préparés. Nous avons profité de cette occasion pour revoir complètement la question de la préparation des sérum-s antigelanténeux par les toxines formolées, et étudier leurs différentes propriétés spécifiques. Au cours de notre exposé, nous avons également donné quelques détails sur les différentes techniques employées.

CHAPITRE I

ESSAIS DE QUELQUES PROCÉDÉS PARTICULIERS D'IMMUNISATION

Les essais de sérothérapie antigelanténeuse entrepris pendant la guerre par l'un de nous avaient abouti à cette conclusion : qu'il était possible d'immuniser le même cheval à la fois contre plusieurs toxines, mais qu'il était préférable, dans la pratique, d'immuniser les chevaux séparément contre les germes principaux des affections gangréneuses, en vue d'obtenir des sérum-s monovalents, plutôt que de rechercher directement sur le même animal la production d'un sérum polyvalent. L'immunisation vis-à-vis d'un seul anaérobie est plus aisée à suivre, les titrages plus faciles et, surtout, les chevaux résistant mieux, on peut mener cette immunisation plus activement, en réduisant au minimum les pertes en animaux.

Les chevaux qui ont servi à nos recherches furent répartis, en quatre séries destinées à fournir les 4 principaux sérum-s : anti-*perfringens*, anti-Vibron septique, anti-histolytique, anti-*œdematiens*. (Le *B. sporogenes*, sans action pathogène durable, mais ayant un rôle actif en association, quelques chevaux furent

préparés avec ce germe également). Tous ces chevaux étaient inoculés avec des doses croissantes de toxine de ces divers anaérobies, toxine obtenue en milieu liquide (bouillon), simplement centrifugée, additionnée de formol (2,5 à 4 p. 1.000 selon les cas), abandonnée quelques jours à l'étuve, puis à la température du laboratoire. Ces toxines formolées, en dépit de leur centrifugation préalable, renfermaient donc toujours une certaine quantité de corps microbiens et leur injection aux chevaux, à doses progressivement croissantes, par voie sous-cutanée, donnait des sérums à la fois antitoxiques et antimicrobiens. Dans chaque série pourtant nous avions décidé de conserver un ou deux chevaux immunisés exclusivement, dès le début de leur préparation, avec des toxines filtrées puis formolées, c'est-à-dire certainement exemptes de microbes, afin d'obtenir divers échantillons de sérums purement antitoxiques.

Ultérieurement enfin et, autant que les disponibilités en chevaux neufs le permirent, un échantillon de sérum exclusivement antimicrobien fut préparé contre le *B. perfringens*, puis contre le Vibron septique, par la seule injection de corps microbiens formolés.

Notre but était non seulement d'obtenir, pour chaque série de sérums monovalents, des échantillons différents : antitoxiques, antimicrobiens, à la fois antitoxiques et antimicrobiens en vue de recherches expérimentales de laboratoire, mais aussi de rechercher, au cours de nos titrages périodiques de tous ces sérums, leurs propriétés thérapeutiques les mieux adaptées aux besoins de la clinique selon leurs modes de préparation différents.

Ce même but pratique nous incitait, en 1927, à tenter, dans chaque série, des essais d'immunisation par des méthodes quelque peu différentes. Les nombreux titrages effectués pendant les dix premiers mois de l'année nous ayant fixé sur les propriétés antitoxiques et antimicrobiennes aussi exactement que possible du sérum fourni par chaque cheval individuellement, un certain nombre d'entre eux étaient répartis dans chaque série pour recevoir, de Novembre 1927 à fin Mars 1928, chacun une préparation particulière. Le sérum prélevé à la dernière saignée de cette période d'expériences fut mis en ampoules, pour chaque animal. Les titrages effectués sur ces

échantillons, de Mars à Octobre 1928, étaient destinés à apprécier s'il y avait bénéfice à utiliser tel ou tel mode particulier d'immunisation.

Dans toutes ces expériences, nous avons continué à utiliser les toxines (centrifugées ou filtrées) et les corps microbiens après action du formol; les modifications de technique adoptées n'avaient pour but que d'influer sur la capacité de réaction de l'organisme par addition de substances diverses aux toxines injectées par voie sous-cutanée. Certaines de ces substances visaient à obtenir une réaction locale aspécifique (tapioca, sang), d'autres, une réaction spécifique (addition aux toxines de corps microbiens formolés, emploi d'anacultures). Autant que possible nous avons conservé dans chaque série un cheval préparé avec de la toxine filtrée formolée (sérum antitoxique), un cheval préparé avec des corps microbiens formolés seuls (sérum antimicrobien), enfin, des chevaux préparés d'après notre méthode ordinaire antérieure (toxine centrifugée formolée).

Chaque procédé différent de préparation était, autant que les disponibilités en chevaux le permettaient, appliqué à deux sujets différents au minimum, la sensibilité individuelle des animaux pouvant entrer également en ligne de compte pour l'appréciation des résultats.

Ce travail porte sur les sérum anti-*perfringens*, anti-Vibrio septique, anti-histolytique, anti-*oedematiens*; le sérum anti-sporogènes n'a pas fait l'objet de titrages particuliers, la difficulté d'avoir toujours à sa disposition une souche de *B. sporogenes* assez virulente pour tuer le cobaye rendant l'appréciation des titrages de ce sérum aléatoire.

Les expériences ayant duré, avec les titrages préliminaires, près de deux ans, un certain nombre de chevaux ont dû être éliminés (mort ou réforme). Nous avons été assez heureux pour conserver pendant toute la durée nécessaire à ces essais 38 chevaux dont le tableau ci-dessous donne la répartition et dont nous avons pu étudier les sérum avant et après les essais d'immunisation par ces divers procédés, de Novembre 1927 à fin Mars 1928 (voir tableau I).

TABLEAU I. — Répartition des chevaux en immunisation.

NUMÉROS des chevaux	PRÉPARATION	OBSERVATIONS
SÉRUMS ANTI-PERFRINGENS.		
219	Toxine centrifugée formolée	
226	(Préparation ordinaire : témoins).	
228	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	
229		
231	Toxine centrifugée formolée + Sang.	Antitoxiques et anti-
232		microbiens.
234	Toxine centrifugée formolée	
235	+ Microbes formolés.	
236	Anaculture.	
237		
233	Toxine filtrée formolée.	Antitoxique pur.
239	Corps microbiens formolés.	Antimicrobien.
SÉRUMS ANTI-VIBRION SEPTIQUE.		
327	Toxine centrifugée formolée	
328	(Préparation ordinaire : témoins).	
329	Anaculture.	
330		
331	Toxine centrifugée formolée + Sang.	Antitoxiques et anti-
332		microbiens.
333	Toxine centrifugée formolée	
335	+ Microbes formolés.	
338	Toxine centrifugée formolée + Tapioca	
339		
336	Toxine filtrée formolée.	Antitoxique.
337	Corps microbiens formolés.	Antimicrobien.
SÉRUMS ANTI-HISTOLYTIQUES.		
311	Toxine centrifugée formolée.	
313	Toxine centrifugée formolée + Tapioca	Antitoxiques et anti-
315	Anaculture.	microbiens.
312	Toxine filtrée formolée.	Antitoxique.
SÉRUMS ANTI-OËDÉMATIENS.		
412	Toxine centrifugée formolée	
413	(Préparation ordinaire : témoins).	
418		
421	Anaculture.	Antitoxiques et anti-
422		microbiens.
423		
420	Toxine filtrée formolée.	Antitoxiques.
424		

I. — Procédés particuliers d'immunisation utilisés.

La préparation des toxines, leur centrifugation et leur traitement par le formol sont connus (1), et nous n'y reviendrons pas ici.

Quelques précisions seulement sont utiles à apporter pour les procédés un peu particuliers d'immunisation que nous mentionnons ci-dessus.

ACTIVATION DE LA RÉACTION ORGANIQUE.

A. — *Par addition de substances aspécifiques.*

Nous avons utilisé l'addition à la toxine centrifugée ordinaire formolée de *tapioca*, ainsi que de *sang*. L'action stimulante générale et leucocytaire locale dans l'un et l'autre procédé est trop bien connue pour que nous y insistions.

Le *tapioca* finement pulvérisé est réparti en tubes et stérilisé au four à flamber. Nous l'avons utilisé selon la technique indiquée par Ramon pour la toxine diphtérique, c'est-à-dire en mettant aseptiquement 50 à 60 grammes environ de tapioca à la surface de 800 cent. cubes de toxine, répartie dans les injecteurs, et en laissant ceux-ci une heure à une heure et demie à l'étuve. Au bout de ce temps, le tapioca gonflé tombe peu à peu au fond de l'injecteur, se ramollit, et on peut injecter le tout, en ayant soin d'agiter fréquemment le milieu pendant toute la durée de l'opération.

Pour les chevaux soumis à l'action stimulante des injections de *sang*, nous avons injecté à ces sujets de 20 à 40 cent. cubes de *sang* sous la peau, en même temps que la toxine. Le prélèvement de sang à la jugulaire était fait au moment même de l'injection au moyen d'une seringue et de quelques

(1) WEINBERG, in WEINBERG et GOY. *C. R. Soc. de Biologie*, 90, 1924, p. 269.
WEINBERG et PRÉVOT. *C. R. de l'Académie des Sciences*, 179, p. 227, 21 juillet 1924
et *C. R. Soc. de Biologie*, 92, 1925, p. 1484.

centimètres cubes d'eau citratée stériles (matériel simple et classique, manuel opératoire élémentaire). Nous avons injecté le sang aux animaux, tantôt au lieu même de l'injection de toxine, tantôt dans un endroit différent sans noter d'inconvénients ni d'avantages particuliers à l'une ou l'autre méthode.

B. — *Par addition de substances spécifiques.*

Il s'agissait, en l'espèce, de corps microbiens ayant le double avantage de provoquer un choc protéique renforcé d'une action spécifique du fait même de leur origine homologue.

Par *anaculture*, nous entendons l'antigène obtenu par addition d'une quantité suffisante de formol du commerce à une culture en milieu liquide pour tuer les germes de cette culture, après un temps convenable de séjour à l'étuve (antigène analogue aux « anatoxines totales » de Ramon). Cet antigène contient donc la toxine aussi bien que la totalité des corps microbiens; il va sans dire qu'avec les germes anaérobies à cultures très abondantes et à spores résistantes, la dose de formol à ajouter est assez considérable : 4 à 5 p. 1.000 et que la vérification de l'absence de vitalité des germes contenus dans cet antigène doit être particulièrement sévère (1).

En ce qui concerne l'addition de *microbes formolés* à la toxine centrifugée ordinaire, celle-ci était faite à des doses progressives variant de 1 à 10 centigrammes, les corps microbiens étant pesés à sec, puis soigneusement broyés dans un mortier stérile avant d'être émulsionnés dans la toxine.

La technique de la préparation de ces microbes anaérobies formolés n'ayant pas été décrite spécialement, nous la résumons brièvement ici, en y apportant quelques précisions sur le rendement moyen en poids que nous avons obtenu avec diverses cultures, et la limite de tolérance observée chez les chevaux à la suite d'injections sous-cutanées.

Prenons pour exemple 4 litres d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon de *B. perfringens*. Cette culture étant centrifugée, le culot de centrifugation est recueilli dans un volume

(1) Par extension, nous entendons sous le terme d'*anaculture*, une culture débarrassée, avant le formolage, d'une partie de ses microbes par une légère centrifugation.

d'eau physiologique correspondant au 1/10 du volume primitif de la culture : soit 400 cent. cubes. On ajoute une quantité de formol suffisante pour détruire les microbes dans un volume de 4 litres de culture, c'est-à-dire 16 cent. cubes (4 p. 1.000). Le milieu est vigoureusement brassé, puis laissé à l'étuve pendant quatre jours. Sa stérilité ayant été contrôlée, on lave les corps microbiens par deux dilutions successives en eau physiologique suivies chacune d'une centrifugation. Le culot de la deuxième opération se présente sous forme d'un magma visqueux, blanc jaunâtre, dans le minimum possible de liquide. Sa dessiccation dans le vide sulfurique donne, en quarante-huit heures à trois jours, un résidu brunâtre pelliculaire et cassant qui, broyé dans un mortier stérile, se transforme en une poudre jaune foncé, brunâtre, représentant la totalité des corps microbiens de la culture initiale. Il faut évidemment tenir compte d'une certaine approximation qui résulte des pertes inévitables aux manipulations. Sous cette forme, les microbes formolés sont d'une manipulation et d'une conservation faciles ; on les répartit dans de petits tubes à hémolyse stériles, bien secs et bouchés, au-dessus de leur tampon de coton, avec un bouchon de caoutchouc que l'on peut paraffiner lorsqu'on veut les expédier ou les conserver. Cette poudre se pèse très facilement ; placée à la dose voulue dans un mortier, elle se ramollit vite, fait pâte puis bouillie par adjonction progressive, très ménagée (goutte à goutte) d'eau physiologique stérile. On obtient ainsi très vite une émulsion blanchâtre, très homogène, des corps microbiens que l'on peut ensuite diluer au degré voulu pour les injections soit dans de l'eau physiologique, soit dans de la toxine.

Nous avons préparé ainsi, sous forme pulvérulente, tous les anaérobies de la gangrène gazeuse. A titre d'indication, nous avons trouvé (moyenne de nos diverses préparations) les rendements suivants :

1 milligramme de corps microbiens du *B. perfringens* formolés et desséchés équivaut approximativement à 3 c. c., 5 de culture initiale ;

1 milligramme de Vibrions septiques formolés et desséchés équivaut au volume initial de 3 c. c., 2 ou 3 c. c., 5 de culture.

1 milligramme du *B. histolyticus* équivaut au volume initial de 5 à 10 cent. cubes de culture, selon l'abondance de cette dernière.

1 milligramme du *B. sporogenes* équivaut au volume initial de 2,5 à 3 cent. cubes.

Émulsionnés en eau physiologique (ou dans de la toxine), ces microbes formolés sont assez bien supportés en injection sous-cutanée, chez le cheval, jusqu'à la dose de 10 centigrammes. Cette dose correspond approximativement d'après ce que nous avons vu précédemment à 350 cent. cubes de la culture primitive, pour le *B. perfringens*, et suffit dans la pratique des immunisations courantes.

Le degré de dilution des microbes formolés a son importance. Une émulsion peu volumineuse, mais trop dense, donne des indurations ou des abcès d'ailleurs assez peu douloureux. Une dilution trop abondante provoque une large induration en placard au lieu d'injection, quelquefois de gros abcès qui peuvent gêner pour les inoculations ultérieures. Il faut donc se tenir dans une juste moyenne en ne dépassant pas le volume moyen de 50, 100 à 150 ou 200 cent. cubes d'émulsion totale, selon la quantité, en poids, de microbes formolés à injecter.

Les indications précédentes font comprendre facilement le procédé d'immunisation des chevaux neufs, exclusivement par des injections sous-cutanées de microbes formolés, émulsionnés dans de l'eau physiologique et employés à des doses progressives, de 1 à 10 centigrammes.

II. — Remarques générales au sujet des techniques utilisées.

Les techniques que nous avons utilisées au cours de ces expériences (agglutination, détermination du pouvoir anti-toxique et du pouvoir anti-infectieux), sont des techniques classiques, courantes. Les quelques lignes que nous y consacrerons ne sont donc pas destinées à les décrire, mais simplement à préciser les conditions particulières de leur emploi, précisions qui sont indispensables pour apprécier la valeur relative des résultats obtenus et pour permettre de renouveler ces expériences dans des conditions aussi identiques que possible.

AGGLUTINATIONS. — Nous avons indiqué dans des communications antérieures les différences parfois assez importantes que

l'on pouvait observer selon que les épreuves d'agglutination étaient pratiquées avec des dilutions de la culture microbienne totale, ou avec des émulsions de corps microbiens centrifugés et repris par l'eau physiologique (1). Nous avons montré que cette différence, en faveur des résultats obtenus avec la culture totale diluée, était particulièrement sensible pour le *B. perfringens*. Il est donc utile de spécifier que, pour toute cette série d'épreuves d'agglutination, nous avons utilisé des émulsions de corps microbiens en eau physiologique provenant directement du culot de la première centrifugation de la culture en bouillon et fait la lecture des résultats au bout de vingt-quatre heures.

NEUTRALISATION DES TOXINES. — Cette neutralisation s'obtient en mettant en contact une dose connue de toxine avec des dilutions progressivement croissantes du sérum à titrer. L'injection du mélange aux animaux sensibles à ces toxines permet d'apprécier le degré plus ou moins parfait de la neutralisation obtenue. Nous signalerons, en étudiant successivement chaque sérum, les difficultés particulières rencontrées ou les remarques que nous ont suggérées telle ou telle série d'expériences.

Les titrages de la toxine *perfringens* ont été effectués sur cobaye, par voie intraveineuse. Ceux de la toxine du Vibrio septique et du *B. histolyticus* ont été faits sur lapin par voie intraveineuse ; ceux du *B. aedematiens* sur souris, par voie sous-cutanée.

Pour la toxine du *B. perfringens*, il est difficile d'obtenir des échantillons d'activité régulière : les uns, peu toxiques, jouissent par contre de propriétés hémolytiques particulièrement accusées ; les autres, peu hémolytiques, ont une action toxique plus marquée. Enfin, beaucoup d'échantillons, couramment obtenus, sont faibles, c'est-à-dire ne tuent le cobaye par voie veineuse qu'à des doses élevées (1 c. c. 1/2, 2 cent. cubes). Dans ces conditions, il est impossible de les utiliser pour apprécier le pouvoir antitoxique des sérum anti-*perfringens*, car la quantité totale du mélange à injecter dans la veine des cobayes, après neutralisation, suffit par son volume à déter-

(1) WEINBERG et BAROTTE : Recherches sur les sérum antitoxiques et antimicrobiens, *C. R. de l'Académie des Sciences*, 185, p. 406, 1927; De la Synergie des anticorps, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 97, p. 1326, 1927.

miner des chocs qui faussent l'interprétation des résultats. Aussi, comme nous le verrons plus loin, avons-nous dû recourir systématiquement à l'emploi de toxines *perfringens* desséchées, extraites par le sulfate d'ammoniaque, pour le titrage du pouvoir antitoxique des sérums anti-*perfringens*.

Avec les toxines du Vibrion septique et du *B. histolytique*, la mort des témoins survenant, pour des toxines de force moyenne, dans des délais variant de quelques minutes à quelques heures au maximum, nous avons employé les toxines simplement centrifugées jusqu'à limpide parfaite. L'injection par voie veineuse au lapin des quelques éléments microbiens, d'ailleurs déjà fortement sensibilisés par l'action du sérum, n'est pas susceptible de fausser l'appréciation des résultats.

Par contre, en raison de la durée d'évolution du processus mortel chez la souris injectée par voie sous-cutanée avec la toxine du *B. aedemaiens* (parfois vingt-quatre à quarante-huit heures) et de la sensibilité de cet animal à l'injection, par cette même voie, de rares éléments, microbiens ou sporulés, du même bacille, il est formellement indiqué de n'utiliser que de la toxine filtrée, et filtrée sur bougies assez denses pour ne laisser passer que la toxine dont la stérilité sera contrôlée par l'ensemencement.

Si avec les toxines filtrées on peut déterminer, à loisir, par un titrage préalable la dose minima mortelle, ces toxines perdant peu de leur activité d'un jour à l'autre, quand elles sont conservées à la glacière et à l'abri de la lumière, il n'en va pas de même avec les toxines centrifugées qui doivent être employées immédiatement ou dans les quelques heures qui suivent la centrifugation. Cette obligation complique les expériences de titrage du fait qu'elle impose de mener parallèlement, et presque simultanément, la détermination de la dose minima mortelle et l'épreuve même de neutralisation.

Si nous mentionnons également que la sensibilité individuelle des lapins varie parfois d'une façon notable vis-à-vis des toxines du Vibrion septique et du *B. histolytique* (1), on com-

(1) A plusieurs reprises, nous avons pu constater la mort de lapins avec des doses de $1/5^{\circ}$ de cent. cube de toxine, par exemple (voie veineuse), alors qu'un animal, aussi identique que possible en poids, résistait au $1/4$ de cent. cube du même échantillon.

prendra la nécessité dans toutes ces épreuves de ne jamais se fier à un seul animal pour déterminer la dose minima mortelle de toxine sous peine de graves nécomptes, en plus ou en moins, en se basant sur cette dose pour l'épreuve elle-même.

En conséquence, il est indiqué de préciser avant tout, la dose minima mortelle d'une toxine au moins sur DEUX animaux de même taille et de même poids, de même qu'on ne se contentera jamais, pour l'expérience elle-même, d'un seul témoin. Economiser un animal ou deux dans ces sortes d'épreuves risque d'aboutir à l'impossibilité d'apprecier ultérieurement l'ensemble de l'expérience, et, par là-même, au gaspillage réel des animaux de laboratoire.

On doit tenir compte aussi de la force de la toxine elle-même. Certains échantillons se prêtent beaucoup moins bien que d'autres à l'appréciation du degré de neutralisation, soit que leur action soit beaucoup trop brutale, soit au contraire que la mort des animaux ne survienne que trop lentement. Il nous semble qu'il n'y a pas intérêt, dans ces sortes d'épreuves, à rechercher la toxine d'activité maxima, comme il est indiqué de le faire quand il s'agit, au contraire, d'immuniser des animaux. Mieux vaut pour les titrages du pouvoir antitoxique d'un sérum recourir à l'emploi d'une toxine moyenne dont l'action sera en général plus constante sur les animaux d'expérience. Ajoutons qu'une grande part de facteurs mal connus (pour ne pas dire absolument inconnus), joue dans la préparation des toxines de nos anaérobies, et que la même souche ensemençée dans deux lots identiques d'un même milieu de culture donne souvent deux toxines d'activité très différente. C'est dire qu'il faut savoir différer une expérience, si l'on n'a obtenu qu'une toxine trop faible ou au contraire trop violente.

Les animaux utilisés devront, bien entendu, être aussi identiques que possible en poids, en taille et en vigueur.

NEUTRALISATION DES CULTURES TOTALES. — La détermination du pouvoir anti-infectieux des sérum implique la neutralisation par des dilutions progressivement croissantes de ces sérum d'une dose connue de culture elle-même. L'évolution ou non, ainsi que la guérison plus ou moins parfaite des lésions consécutives à l'injection du mélange aux animaux, permet d'appré-

cier la neutralisation plus ou moins complète de la culture.

Nous avons effectué toutes ces épreuves sur cobayes, par inoculation intramusculaire du mélange sérum-culture dans la masse musculaire de la cuisse.

Tandis que le mélange d'une toxine limpide avec le sérum neutralisant correspondant ne donne lieu *in vitro* à aucun phénomène macroscopique appréciable (du moins aux dilutions du sérum utilisées : 1/200^e à 1/1.000^e, 1/3.000^e), le mélange des mêmes dilutions de sérum avec les cultures donne le plus souvent lieu à une agglutination très visible des microbes qui se déposent, pendant le temps de contact nécessaire à la neutralisation, au fond du verre, tantôt sous forme nuageuse, tantôt en véritables agglomérats. Nous avons observé que si, effectivement, ce sont les sérums doués du pouvoir agglutinant le plus actif qui donnent généralement ce phénomène macroscopique avec le plus d'intensité, on voit aussi des sérums très agglutinants ne changer que très peu l'aspect homogène de la culture pendant la durée du contact. De même, il serait inexact de chercher à déduire de l'apparition plus ou moins précoce, de cette agglutination *in vitro*, ou de son degré d'intensité, des indications sur le pouvoir anti-infectieux du sérum.

Une seule observation pratique, banale, s'impose à ce sujet : c'est d'avoir soin, en prélevant la quantité du mélange à injecter au cobaye, de bien homogénéiser à nouveau le milieu, afin de ne pas injecter exclusivement à l'animal soit la partie claire, surnageante, soit la portion la plus trouble du mélange.

Il faut tenir compte aussi dans l'établissement des protocoles d'expérience et dans l'interprétation des résultats du fait primordial suivant : l'évaluation du pouvoir anti-infectieux d'un sérum peut varier très sensiblement selon que l'on utilise comme dose d'épreuve de culture une dose très proche de la dose minima mortelle ou une dose beaucoup plus considérable. En général, il faut toujours pour l'épreuve définitive utiliser une dose supérieure à la dose minima mortelle : le double environ. Cette observation à son importance particulière avec la culture du *B. perfringens* et du *B. œdematiens*, car les doses limites de ces cultures, au voisinage de la dose minima mortelle, sont trop facilement neutralisables et les témoins eux-mêmes inoculés avec ces doses faibles de culture

peuvent ne mourir que très irrégulièrement, ou ne pas mourir du tout. L'inconvénient est moindre avec les cultures du Vibrion septique dont une dose même relativement faible aboutit beaucoup plus régulièrement chez le cobaye (quoique avec retard), à l'évolution de lésions gangrénées mortelles.

Comme nous cherchions surtout à établir la valeur comparée du pouvoir anti-infectieux des sérum, préparés par différents procédés, beaucoup plus que leur valeur neutralisante absolue, nous avons pratiqué, avec les cultures du *B. perfringens* et du *B. œdematiens*, deux séries d'essais : la première avec des doses faibles, la seconde avec des doses relativement élevées (épreuves sévères).

Quoi qu'il en soit, il est indispensable, si l'on veut qu'une expérience puisse être appréciée par rapport à d'autres expériences similaires effectuées ultérieurement ou dans d'autres laboratoires, d'exprimer toujours approximativement la valeur de la dose d'épreuve par rapport à la dose minima mortelle de la culture (ou de la toxine) utilisée.

DURÉE ET TEMPÉRATURE DE CONTACT. DURÉE D'OBSERVATION DES ANIMAUX ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

Pour apprécier le pouvoir neutralisant d'un sérum vis-à-vis d'une toxine ou d'une culture, on peut, comme le préconisent certaines techniques, effectuer leur mélange et les injecter aussitôt à l'animal d'expérience, le contact s'effectuant directement *in vivo*. D'autres expérimentateurs préfèrent maintenir les éléments du titrage quelque temps au contact *in vitro* avant de les inoculer. Quels que soient les avantages ou inconvénients de l'une ou de l'autre manière de procéder, il sera toujours indispensable pour rendre les expériences comparables d'un laboratoire à l'autre de bien spécifier la technique employée. Dans toutes nos expériences, le sérum dilué a été mis au contact de la culture et de la toxine *in vitro* pendant une heure à la température de l'étuve à 37°. Dans des expériences précédentes, nous avions constaté qu'une demi-heure de contact, à la température du laboratoire, suffit à obtenir une bonne neutralisation. Les premiers titrages de nos sérum ayant été effectués

par contact d'une heure à l'étuve, nous avons continué d'après cette technique. Lorsque la durée de contact et le séjour à l'étuve sont aussi longs, il est indiqué, pour être absolument précis, de maintenir les doses d'épreuve de toxine ou de culture, convenablement diluées, dans de l'eau physiologique, le même temps à l'étuve, bien que leur activité ne soit pas très sensiblement modifiée de ce fait.

Il sera utile, toujours pour rendre les expériences comparables entre elles, de préciser la durée d'observation des animaux après l'injection d'épreuve, ainsi que les notations adoptées dans l'appréciation du degré de neutralisation.

Pour la neutralisation des toxines, la durée d'observation dépendra du temps dans lequel la mort survient pour les témoins. Par exemple, avec les toxines du Vibrion septique et du *B. histolytique*, la mort des témoins survient le plus souvent en quelques minutes (dix à vingt minutes), plus rarement en quelques heures. Les animaux seront donc observés pendant les vingt-quatre heures qui suivent l'injection.

Lorsque la neutralisation de la toxine est complète, les animaux injectés peuvent présenter néanmoins un malaise plus ou moins accusé quelques instants après l'injection du mélange dans la veine de l'oreille, mais ils se remettent rapidement et recouvrent leur état primitif de bonne santé, de vivacité et d'appétit.

Lorsque la neutralisation n'est que partielle, la durée de la survie, l'intensité plus ou moins violente de la crise mortelle, permettent d'en apprécier le degré. Pourtant, tous les animaux ayant retrouvé au bout de vingt-quatre heures les apparences de la santé ne sont pas absolument sauvés; quelques-uns maigrissent assez rapidement et meurent dans des délais très variables, de deux à plusieurs jours. Ces effets à échéance lointaine de la toxine sont également à noter; aussi faut-il conserver soigneusement l'indication des marques distinctives des animaux inoculés pour continuer à les surveiller.

Avec la toxine du *B. oedematiens*, l'oedème plus ou moins accusé de la région abdominale où est injecté le mélange toxine-sérum chez les souris (même chez celles qui guérissent), la durée de cet oedème, l'état général des animaux après guérison, sont autant d'éléments d'appréciation. L'amaigrissement, les héma-

turies pour la toxine du *B. perfringens*, chez les sujets ayant résisté aux doses mortelles pour les témoins, permettent de juger du degré plus ou moins satisfaisant de neutralisation.

Avec les CULTURES (appréciation du pouvoir anti-infectieux), il est rare que l'on n'observe pas dans les vingt heures qui suivent l'injection une réaction locale plus ou moins vive ; mais au lieu d'un œdème crépitant, aboutissant aux délabrements graves des gangrènes gazeuses, on observe une tuméfaction chaude, douloureuse, avec rougeur des téguments qui témoigne au contraire de la réaction de l'organisme.

Ce n'est donc guère qu'au bout de vingt-quatre heures au minimum que l'on peut apprécier la gravité des lésions locales restantes, car la première réaction inflammatoire se résoud parfois complètement sans laisser la moindre induration. Si la neutralisation a été moins parfaite, les lésions locales restent plus accusées, définitives, ou se résorbent lentement. D'autre part, les survies sont parfois assez longues (trois à quatre jours) ; puis, on assiste souvent, assez brusquement, à une évolution gangrénouse tardive fatale.

Après la mort des témoins (vingt-quatre à trente-six heures), il faut donc, pour bien apprécier le pouvoir anti-infectieux, disposer de quatre à six jours pour être fixé sur l'évolution définitive des lésions locales que peuvent présenter les animaux chez lesquels le mélange injecté n'était pas absolument neutralisé.

Pour l'appreciation du pouvoir anti-infectieux d'un sérum vis-à-vis d'une dose connue (deux doses minima mortelles) de culture du *B. perfringens*, on notera, par exemple :

Neutralisation complète très bonne, pour les animaux guérissant sans aucune lésion au point d'inoculation ;

Neutralisation bonne, pour les animaux guérissant avec de légères indurations qui s'atténuent peu à peu ;

Neutralisation incomplète, pour les animaux conservant de grosses lésions locales, cicatricielles, quoique leur état général reste satisfaisant.

On doit considérer comme insuffisantes les neutralisations n'assurant qu'une survie limitée aux animaux, ou une guérison durable, mais avec de graves lésions indélébiles et un état général précaire.

Chaque expérimentateur adoptera très vite une notation personnelle qui lui permettra de comparer les résultats, d'une expérience à l'autre. Nous ne saurions trop conseiller d'exprimer ces résultats sous la forme condensée de tableaux, faciles à consulter rapidement, sous la forme de courbes et de schémas. Il ne faut d'ailleurs attribuer à ces représentations schématiques que la valeur relative qu'elles peuvent avoir : elles n'expriment, pour des expériences où tous les facteurs sont éminemment variables et difficiles à stabiliser (virulence, pouvoir toxique, etc.), que des moyennes ; pourtant, nous pensons qu'établies par les mêmes expérimentateurs, elles constituent une documentation réelle, parlant aux yeux, facile à consulter et à comparer d'une série d'épreuves à une autre.

C'est pourquoi nous les avons largement utilisées au cours de ce travail.

CHAPITRE II

ÉTUDE PARTICULIÈRE DES DIVERS SÉRUMS

I. — Etude des divers sérums anti-perfringens.

POLVOIR ANTITOXIQUE.

TOXINE. — Nous avons signalé la difficulté d'obtenir des toxines *perfringens* d'activité régulière, même en partant d'une souche unique et en utilisant des milieux de culture aussi identiques que possible. La prédominance de l'activité hémolytique pour certains échantillons, de l'activité neurotoxique pour d'autres, rend la comparaison des divers titrages à peu près impossible. Le volume du mélange à inoculer après neutralisation par voie veineuse, chez le cobaye, ne peut guère dépasser 1 c.c. 1/2 sans que l'on observe des phénomènes de choc qui faussent l'interprétation des résultats ; de ce fait toutes les toxines faibles qui ne tuent pas nettement le cobaye à la dose maxima de 1 cent. cube dans la veine, en dix-huit à

vingt-quatre heures, sont inutilisables pour les titrages du pouvoir antitoxique.

Ces considérations nous ont amené à n'utiliser que des toxines *perfringens* très actives d'abord, et sous forme de toxine desséchée après extraction au sulfate d'ammoniaque.

Nous avons pratiqué cette extraction d'après le procédé classique, utilisé depuis plusieurs années à notre laboratoire (1), soit pour obtenir des toxines pulvérulentes stables en vue des opérations de titrage, soit même pour l'immunisation des chevaux. Nous ne reviendrons pas sur les détails de technique de l'opération appelée à tort « précipitation » des toxines par le sulfate d'ammoniaque, puisque le complexe toxique formé sous l'action du sulfate d'ammoniaque dans la toxine liquide fraîchement préparée a, au contraire, une tendance très nette à surnager à la surface du liquide, où se fait sa récolte en vue d'une dessiccation ultérieure dans le vide sulfurique.

Nous mentionnerons seulement que si le sulfate d'ammoniaque simplement « purifié » suffit dans les opérations courantes d'extraction des toxines de nos principaux anaérobies (*B. perfringens*, *Vibrio septique*, *B. histolyticus*), lorsqu'on veut opérer sur des volumes importants de toxine liquide, il paraît préférable d'employer du sulfate d'ammoniaque chimiquement « pur » pour l'obtention des toxines desséchées destinées aux opérations de titrages. La quantité de sulfate d'ammoniaque à utiliser reste sensiblement la même (600 à 750 grammes par litre de toxine); le produit d'extraction obtenu avec le sulfate d'ammoniaque pur paraît, par contre, plus homogène, plus facile à pulvériser finement après dessiccation, et surtout se redissout en totalité très facilement sans laisser de résidu, comme il arrive parfois avec les toxines extraites au sulfate d'ammoniaque « purifié ».

Pour toutes nos opérations de titrage antitoxique des sérum anti-*perfringens*, nous avons utilisé un seul et même lot de toxine desséchée, cette toxine provenait d'une toxine *perfringens* qui, fraîche, tuait le cobaye de 350 à 400 grammes à la dose

(1) M. WEINBERG. A propos de la préparation des sérum antigangréneux. *C. R. Soc. de Biol.*, 89, 1923, p. 463.

intraveineuse de 1/2 cent. cube, avec la double symptomatologie classique des accidents d'hématurie, des paralysies et crises nerveuses qui caractérisent l'action de la toxine du *B. perfringens*.

Aux doses inférieures au 1/2 cent. cube, les cobayes, très malades, présentaient de violentes hématuries, mais la mort n'était pas de règle.

Desséchée, cette même toxine a été utilisée au taux de 2 centigr., 5 de poudre, en dissolution dans 10 cent. cubes d'eau distillée stérile. 1 cent. cube de cette dissolution tuait régulièrement les cobayes témoins, avec de fortes hématuries et des symptômes nerveux typiques dans des délais variant de une à douze ou dix-huit heures.

Les doses de 1/2 et même 1/4 de centimètre cube provoquaient chez les cobayes, même de forte taille (400 grammes), des hématuries abondantes, parfois la mort au 1/2 cent. cube, mais d'une façon irrégulière et dans des délais trop longs et trop peu constants pour utiliser cette dose dans les titrages.

ÉPREUVES DE NEUTRALISATION. — Elles furent faites, comme avec de la toxine fraîche, en laissant une heure au contact à la température du laboratoire et à l'obscurité, 1 cent. cube de la dissolution toxique ci-dessus avec des doses décroissantes des divers sérums à titrer.

Les animaux d'expérience étaient des cobayes de 350 à 400 grammes, répartis en lots aussi homogènes que possible. Le mélange, effectué de façon que le volume total à inoculer à chaque animal ne dépasse jamais 1 cent. 1/2 au maximum, était inoculé dans la veine fémorale.

On trouvera ci-après trois exemples d'expériences de neutralisation antitoxique pratiquée avec chacun des sérums type anti-*perfringens* : sérum mixte (antitoxique et antimicrobien à la fois), préparé avec des toxines centrifugées formolées, sérum purement antitoxique préparé avec des toxines filtrées formolées, sérum purement antimicrobien préparé exclusivement avec des corps microbiens formolés. Grâce à l'emploi de la toxine desséchée extraite au sulfate d'ammoniaque, tous ces essais ont pu s'effectuer en séries avec des résultats d'une constance remarquable et de grandes facilités de manipulations.

**Exemples de neutralisation de la toxine perfringens
par trois sérums antiperfringens-types.**

(Toxine desséchée extraite au sulfate d'ammoniaque.
Épreuve sur cobayes par voie veineuse.)

DILUTION DU SÉRUM	TOXINE en cent. cubes	RÉSULTATS	NEUTRALISATION du pouvoir	
			Hémolytique	Toxique
A. — SÉRUM n° 219 (à la fois antitoxique et antimicrobien).				
1/100	1	Emissions d'urine normales, survie.	+	+
1/200	1	Emissions d'urine normales, survie.	++	++
1/400	1	Emissions d'urine normales, survie.	++	++
1/500	1	Emissions d'urine normales, survie.	+	++
1/1.000	1	Hémoglobinurie tardive, légère, survie.	Incomplète.	++
1/1.200	1	Hémoglobinurie tardive, légère, survie.	Incomplète.	++
1/1.300	1	Hémoglobinurie ou hématurie, survie.	—	++
1/2.000	1	Hématuries, survie.	—	++
1/2.500	1	Hématuries, survie.	—	++
1/3.000	1	Hématuries, survie.	—	++
1/4.000	1	Hématuries abondantes, mort en 48 heures à 3 jours.	—	Incomplète.
1/5.000	1	Hématuries abondantes, mort dans la nuit.	—	—
<i>Quatre cobayes témoins de même poids, sans sérum, meurent dans des délais variant de 1 à 12 heures avec des hématuries abondantes, ainsi que des symptômes de paralysie et de crises nerveuses.</i>				
B. — SÉRUM n° 233 (antitoxique pur).				
1/500	1	Emissions d'urine normales, survie.	+	+
1/800	1	Urine rosée, survie.	Incomplète.	+
1/1.000	1	Hémoglobinurie légère, survie.	—	+
1/2.000	1	Hémoglobinurie, survie.	—	+
1/2.500	1	Hématurie nette, survie.	—	+
1/3.000	1	Forte hématurie, mort dans la nuit.	—	+
<i>Deux cobayes témoins meurent, dans les mêmes délais et avec les mêmes symptômes que dans l'expérience précédente.</i>				
C. — SÉRUM n° 239 (antimicrobien pur).				
1/100	1	Emissions d'urine normales, survie.	+	+
1/200	1	Emissions d'urine normales, survie.	+	+
1/500	1	Légère hémoglobinurie, survie.	Incomplète.	+
1/800	1	Hémoglobinurie, survie.	—	+
1/1.000	1	Hémoglobinurie, survie.	—	+
1/1.500	1	Hématurie, survie.	—	+
1/2.000	1	Hématurie, survie.	—	+
1/2.500	1	Hématurie, survie.	—	+
1/3.000	1	Hématurie, mort dans la nuit.	—	+
<i>Deux cobayes témoins meurent dans la nuit, avec les doubles symptômes très nets d'hématurie et d'intoxication des centres nerveux.</i>				

Il résulte de l'examen de ces tableaux plusieurs constatations d'intérêt général :

1° Au point de vue antitoxique, les sérum anti-*perfringens* manifestent leur activité par une double action : anti-hémolytique et antitoxique.

Aux taux élevés de sérum, l'action de la toxine est totalement annihilée : les cobayes présentent bien après l'injection intraveineuse du mélange sérum et toxine des malaises ; mais on n'observe que des émissions d'urine normales, sans trace d'hémoglobinurie aucune. Bien entendu, ces animaux survivent, sans paralysies ni crises nerveuses.

A des taux moindres de sérum, on voit réapparaître progressivement l'activité hémolytique de la toxine : elle se manifeste selon son intensité, soit par de simples émissions rosées, soit par de l'hémoglobinurie (légère ou accusée), soit par de véritables hématuries.

On constate que des cobayes, même ayant présenté d'abondantes hématuries, survivent et ne présentent pas de symptômes d'intoxication nerveuse (parésies ou crises).

2° Le taux de neutralisation de l'hémolysine du *B. perfringens* est sensiblement inférieur à celui de neutralisation de sa neurotoxine. Il varie du 1/500 au 1/1.000 pour l'hémolysine, tandis qu'il peut atteindre le 1/2.500, le 1/3.000 et même le 1/4.000 pour la neuro-toxine.

3° La comparaison de l'activité des trois sérum différents donne les résultats suivants :

	TAUX anti-hémolytique	TAUX anti-neurotoxique
Sérum mixte (n° 219).	1/1.000 à 1/4.200	1/3.000 à 1/4.000
Sérum antitoxique (n° 233). . . .	1/800	1/2.500
Sérum antimicrobien (n° 230). . .	1/500	1/2.500

Si le mode de préparation des sérum ne paraît pas influer très sensiblement sur leur activité neurotoxique, on remarque une différence très nette d'activité en ce qui concerne leur pouvoir anti-hémolytique. Le sérum antimicrobien pur est beaucoup moins actif que le sérum antitoxique, lui-même inférieur aux sérum mixtes.

4° Si l'on évalue l'activité antitoxique globale d'un sérum anti-*perfringens* par l'ensemble de son activité anti-hémolytique

TABLEAU II. — Pouvoir anti-infectieux des sérum anti-perfringens.

A. — INCUBATION D'ÉPREUVE : 1/10 DE CENTIMÈTRE CUBE (LÉGÈREMENT SUPÉRIEURE À UNE DOSE MORTELLE).

SÉRUM N°	PRÉPARATION	DILUTION	COBAYES INOCULÉS DANS LA CUISSE (injection intramusculaire)		OBSERVATIONS
			Examen au bout de 24 heures	Examen après 2 et 3 jours	
249	Toxine centrifugée formolée.	1/200 1/300	1/10 Lésion locale. Lésion locale accentuée, œdème de la région inguinale.	Guérison, légère induration locale. Guérison, légère induration locale.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
226	Toxine centrifugée formolée.	1/200 1/300	1/10 Lésion locale, œdème de la région inguinale. Aucune lésion.	Guérison, induration locale assez accentuée. Guérison complète.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
228	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	1/200 1/300	1/10 Fort réaction locale. Lésion locale.	Guérison complète. Guérison complète.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
229	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	1/200 1/300	1/10 Peu de réaction. 1/10 Peu de réaction.	Guérison sans lésions. Guérison sans lésions.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
231	Toxine centrifugée formolée + Sang.	1/200 1/300	1/10 Réaction locale. 1/10 Réaction locale.	Guérison sans lésions. Guérison sans lésions.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
232	Toxine centrifugée formolée + Sang.	1/200	1/10 Grosse lésion locale, œdème inguinale.	Induration de la cuisse, guérison.	Sérum antitoxique et antimicrobien.

				Guérison sans lésions.
+ Microbes formolés.	1/500	1/40	Peu de réaction.	
Toxine centrifugée + Microbes formolés.	1/200 1/500	1/10 1/10	Légère réaction locale. Légère réaction locale.	Guérison complète. Guérison avec légère induration de la cuisse.
Anaculture.	1/200 1/500	1/10 1/10	Réaction locale, Réaction locale avec œdème inguinal.	Guérison sans lésions. Guérison avec induration de la cuisse.
Anaculture.	1/200 1/500	1/10 1/10	Réaction locale, Grosse réaction locale, œdème inguinal.	Guérison complète. Guérison complète.
Toxine filtrée formolée.	1/200 1/500	1/10 1/10	Réaction locale, Réaction locale.	Guérison avec légère induration. Guérison complète.
Corps microbiens formolés.	1/100 1/200	1/0 1/10	Lésion locale importante, œdème abdominal. Lésion locale importante, œdème abdominal et sternal.	Guérison avec induration de la cuisse. Mort en 48 heures.
Témoin	"	1/10 " " " "	Lésion locale énorme. Œdème envahissant des régions abdominales et sterno-gastrales. Mauvais état général.	Mort en 36 à 40 heures. Mort en 48 heures.
	"	1/20	Grosse lésion locale, œdème abdominal.	Mort en 36 à 40 heures.
				Guérison lente avec induration de la cuisse.

TABLEAU III. — Pouvoir anti-infectieux des sérums anti-perfringens.
B. — INOCULATION D'ÉPREUVE : 1/2 CENT. CUBE (QUATRE À CINQ DOSES MORTELLES ENVIRON).

SÉRUMS n° de l'épreuve	PRÉPARATION	BILLETTON	CONTRE INOCULES DANS LA CUISSE (injection intramusculaire)		OBSERVATIONS
			DOSSE à l'épreuve en cent. cube (en centre, double)	Examen au bout de 24 heures	
249	Toxine centrifugée formolée.	1/200 1/300	1/2 1/2	Lésion locale, léger œdème inguinal. Mort dans la nuit.	Guérison complète avec légère induration.
226	Toxine centrifugée formolée.	1/200 1/500	1/2 1/2	Mort (survie de quelques heures). Mort dans la nuit.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
428	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	1/200 1/300	1/2 1/2	Légère réaction locale. Lésion locale, léger œdème inguinal.	Guérison complète, sans lesions. Guérison avec légère indura- tion locale.
229	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	1/200 1/500	1/2 1/2	Peu de réaction locale. Mort dans la nuit.	Guérison, sans lesions.
234	Toxine centrifugée formolée + Sang.	1/200 1/300	1/2 1/2	Réaction locale, léger œdème inguinal. Grosse lésion, locale, œdème inguinal.	Guérison, avec petite indura- tion de la cuisse. Guérison, avec lésion locale.
232	Toxine centrifugée formolée + Sang.	1/200 1/500	1/2 1/2	Lésion locale accentuée, œdème abdominal. Grosse lésion, œdème écrasant.	Guérison, avec induration locale. Mort en 48 heures.

Microbes formolés.		Lesions graves.		Mort en 36 heures.	
Toxine centrifugée + Microbes formolés.		1/200 1/500	4/2 1/2	Mort en 24 heures. Lésions graves, œdème en- vahissant, état grave.	Mort en 4 jours.
Anaculture.		1/200 1/500	1/2 1/2	Peu de lésions. Lésion accentuée de la cuisse, léger œdème.	Guérison complète. Guérison avec induration lo- cale, mauvais état.
Anaculture.		1/200 1/500	1/2 1/2	Lésions graves, œdème sterno- abdominal. Etat grave.	Guérison avec lésions éten- dues, mauvais état. Mort en 48 heures.
Toxine filtrée formolée.		1/200 1/500	1/2 1/2	Lésions locales graves, œdème sterno-abdominal. Etat grave.	Guérison avec lésions éten- dues, état précaire. Mort en 30 heures.
Corps microbiens formolés.		1/50 1/100	4/2 1/2	Etat grave. Etat grave.	Mort en 48 heures. Mort en 48 heures.
Témoins		"	1/2 1/2 0	Mort dans la nuit. Mort dans la nuit. Mort en 24 heures.	Sérum antimicrobien pur.
	"	1/4		Mort dans la nuit.	
	"	11/10		Etat grave.	Mort en 30 heures.

d'une part et de son activité anti-neurotoxique d'autre part, on constate que le maximum d'activité revient aux sérums préparés avec des toxines formolées contenant encore des corps microbiens.

Les sérums préparés avec des toxines filtrées formolées se classent en deuxième ligne seulement.

Quant aux sérums préparés uniquement avec des corps microbiens formolés, ils arrivent au point de vue de leur activité antitoxique en dernière ligne, comme il était d'ailleurs logique de le penser. Le fait même qu'ils jouissent de propriétés antitoxiques évidentes mérite par contre d'être signalé.

POUVOIR ANTI-INFECTIEUX.

SOUCHE UTILISÉE. — Nous avons recherché la valeur comparative du pouvoir anti-infectieux des différents sérums anti-*perfringens* vis-à-vis de la souche homologue ayant servi à l'immunisation des chevaux. Suivant l'échantillon de cette souche utilisé, on obtient des cultures légèrement différentes comme pouvoir pathogène. La dose mortelle pour un cobaye de poids moyen (250 à 300 grammes), par injection intramusculaire dans la cuisse, varie pour une culture de vingt-quatre heures, en bouillon, de 1/2 à 1/10 de centimètre cube. Par passages *in vivo*, on obtient assez facilement des échantillons qui tuent au 1/20 de centimètre cube, plus rarement au 1/30.

NEUTRALISATION. — Les épreuves de neutralisation ont été faites sur le cobaye, par injection du mélange sérum + culture dans les muscles de la cuisse.

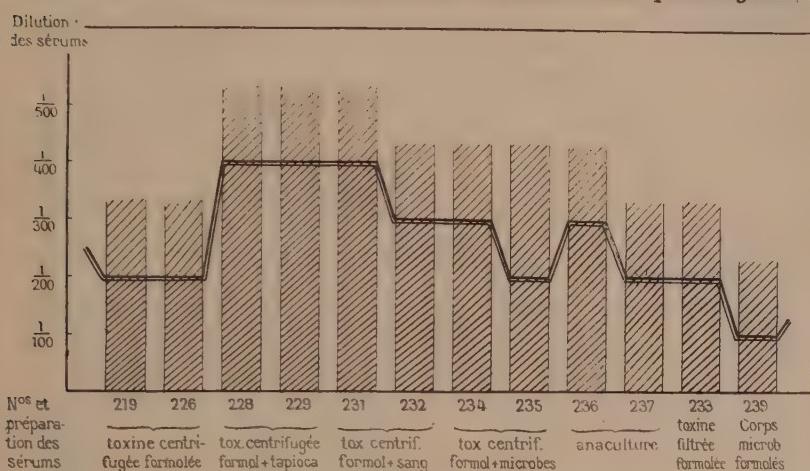
Le temps de contact préalable *in vitro*, à la température de l'étuve ou du laboratoire, était de une heure.

Des expériences préliminaires nous ont montré des divergences assez importantes de résultats selon que l'on opère au voisinage de la dose mortelle ou avec des doses d'épreuve sensiblement supérieures. Nous avons donc effectué l'essai comparatif des divers sérums soit avec des doses mortelles limites (voir tableau II), soit avec des doses mortelles assez élevées (voir tableau III).

RÉSULTATS. — L'examen de ces deux tableaux (tableaux II et III), ainsi que du schéma annexé (tableau IV), fixera mieux que de longs commentaires sur les résultats obtenus.

Faisons seulement remarquer que l'épreuve de neutralisation effectuée avec 1/10 de centimètre cube comme dose d'épreuve (tableau II) donne une approximation plus exacte de la valeur absolue des sérum au point de vue anti-infectieux et que ces

TABLEAU IV. — Pouvoir anti-infectieux des sérum anti-perfringens (1).



Neutralisation complète, hachures serrées; incomplète, hachures espacées.

résultats se rapprochent de ceux du schéma qui représente très sensiblement la moyenne de nos expériences.

L'épreuve faite avec 1/2 cent. cube (tableau III) était particulièrement sévère, cette dose représentant environ quatre à cinq fois la dose minima mortelle de la culture utilisée. Du moins a-t-elle l'intérêt de nous fixer sur l'activité relative des différents sérum.

Le pouvoir anti-infectieux des sérum anti-*perfringens*, à la fois antitoxiques et antimicrobiens, varie du 1/200 pour les moins actifs, au 1/400 pour les meilleurs. Avec des doses de culture très proches de la dose minima mortelle, on peut obtenir la neutralisation plus ou moins parfaite (guérison avec ou sans

(1) Dose d'épreuve : une fois et demie à deux fois la dose minima mortelle de culture.

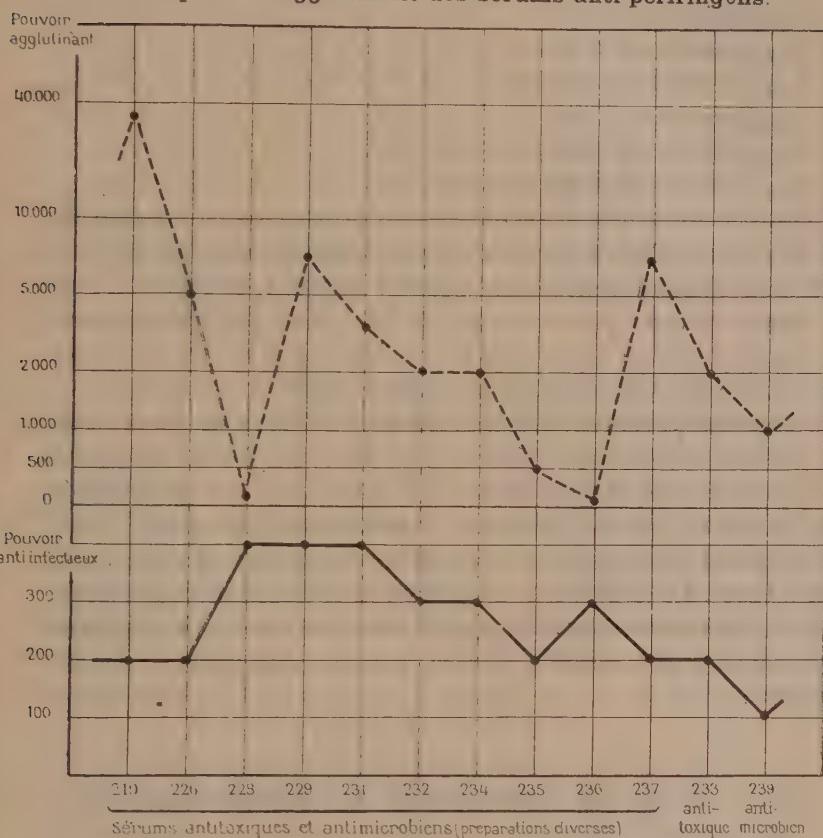
TABLEAU V. — Pouvoir agglutinant des sérum anti-perfringens.

N°	PRÉPARATION	TESTS	
		1	2
249	Toxine centrifugée formolée.	++	+
	Toxine centrifugée formolée.	++	+
226	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	++	?
228	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	-	+
229	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	++	+
231	Toxine centrifugée formolée + Sang.	++	+
232	Toxine centrifugée formolée + Sang.	++	+
234	Toxine centrifugée formolée + Microbienstformolés.	++	++
235	Toxine centrifugée formolée + Microbienstformolés.	+	+
236	Anaculture.	+	?
	Anaculture.	++	+
233	Toxine filtrée formolée.	++	+
239	Corps microbiens formolés.	++	+

lésions locales) avec des dilutions de sérum au 1/500 et vraisemblablement moindres encore.

Dans toutes les expériences, l'insuffisance du sérum 239,

TABLEAU VI. — Comparaison entre le pouvoir anti-infectieux et le pouvoir agglutinant des sérums anti-perfringens.



NOTA. — L'indication du pouvoir antitoxique moyen des sérums *antiperfringens* ne figure pas sur ce graphique; il aurait fallu y schématiser séparément leur pouvoir antihémolytique et leur pouvoir antineurotoxique, dont les taux diffèrent.

préparé uniquement avec des corps microbiens formolés (sérum purement antimicrobien), ressort nettement. Comparativement, le sérum purement antitoxique n° 233, préparé avec de la toxine filtrée, puis formolée, est plus efficace, puisqu'il se classe avec les sérums neutralisants au 1/200.

POUVOIR AGGLUTINANT.

Sur ces 12 sérum :

- 1 agglutine au 1/25.000 la souche homo'ogue;
- 1 agglutine au 1/7.000.
- 1 agglutine au 1/5.000.
- 5 agglutinent au 1/2.000.
- 1 agglutine au 1/750.
- 1 agglutine au 1/500.
- 2 agglutinent du 1/50 au 1/100.

Il est à noter que le sérum n° 233 préparé par injections de toxine filtrée, c'est-à-dire normalement antitoxique pur, donne un taux d'agglutination relativement élevé (1/2.000).

Deux chevaux préparés avec de la toxine centrifugée renfermant encore des éléments microbiens ne manifestent qu'un très faible pouvoir agglutinant (1/50 à 1/100).

Le sérum purement antimicrobien (n° 239) n'a qu'un pouvoir agglutinant médiocre (1/750).

Ces taux sont sensiblement les mêmes que ceux déterminés sur d'autres échantillons des mêmes sérum plusieurs mois auparavant (« Synergie des anticorps ». Ces *Annales*, 42, juin 1928). La différence des procédés d'immunisation utilisés depuis Novembre 1927 ne paraît donc pas avoir eu non plus d'influence très notable sur le pouvoir agglutinant de ces sérum.

II. — Étude des divers sérum anti-Vibron septique.

POUVOIR ANTITOXIQUE.

TOXINE. — Une culture de Vibron septique, de vingt-quatre à trente-six heures en bouillon glucosé (1 p. 1.000), centrifugée jusqu'à limpidité complète du milieu, donne une toxine que l'on peut utiliser par voie veineuse chez le lapin pour les essais de neutralisation, sans être obligé de recourir à la filtration, sous réserve de l'utiliser immédiatement.

La souche utilisée était la souche de Vibron septique servant

aux expériences courantes du laboratoire, ainsi qu'à l'immunisation des chevaux. Cette souche donne régulièrement des toxines tuant un lapin de 2 kilogrammes, par voie veineuse, aux doses de $1/5$ à 1 cent. cube. Au cours de ces derniers essais, nous n'avons rencontré qu'exceptionnellement des toxines tuant au $1/10$ de centimètre cube, assez fréquemment des toxines tuant au $1/4$ et rendant l'animal très malade au $1/10$. Les échantillons de toxines fortes provoquent parfois chez le lapin des crises trop rapidement mortelles (quelques minutes) et leur emploi accuse fâcheusement l'action des sensibilités individuelles inévitables chez les animaux d'expérience, rendant parfois difficile l'interprétation des résultats. Nous avons utilisé de préférence des toxines moyennes tuant un lapin de 2 kilogrammes à 2 kgr. 500 aux doses de $1/2$ à $3/4$ de centimètre cube.

ÉPREUVES DE NEUTRALISATION. — Elles ont été effectuées sur des lapins de 2 kilogrammes à 2 kg. 500, en moyenne, par injection du mélange : toxine-sérum dans la veine marginale de l'oreille.

La détermination de la dose minima mortelle de toxine étant faite au moment même de l'expérience, il est indiqué de se tenir légèrement au-dessus de cette dose pour l'épreuve de neutralisation, surtout lorsqu'il s'agit, comme c'était notre but, de déterminer la limite extrême de protection pour comparer l'activité de divers sérums, beaucoup plus que de déterminer leur pouvoir absolu de neutralisation.

Nos résultats sont donc vraisemblablement inférieurs à ceux que nous aurions obtenus en utilisant une dose d'épreuve plus strictement voisine de la dose minima mortelle de toxine ; par contre, ils donnent une approximation plus certaine de l'activité relative des divers sérums.

La neutralisation est obtenue par contact de la toxine et du sérum, aux différentes dilutions, pendant une heure, soit à l'étuve, soit à la température du laboratoire.

La moyenne des titrages effectués sur nos sérums thérapeutiques préparés avec des toxines formolées, en 1927, ayant montré leur efficacité antitoxique certaine au $1/500$ et très généralement au $1/1000$, nous avons limité nos essais de neu-

Activité antitoxique des sérums anti-vibrio septique.

SÉRUMS n°s	1 ^o D'APRÈS LA MOYENNE DES TITRAGES DE L'ANNÉE 1927 (DOSE D'ÉPREUVE : UNE DOSE MORTELLE)		2 ^o D'APRÈS LES EXPÉRIENCES DU 15 AU 30 MARS 1928 (DOSE D'ÉPREUVE : DEUX DOSES MORTELLES ENTRON)	
	1/500	1/1.000	Observations	
327	Bonne.	Bonne.	Un essai satisfaisant au 1/4.500. <i>Voir expérience particulière.</i>	Bonne.
328	Bonne.	Bonne.	Un essai satisfaisant au 1/4.500.	Inconstante. Nulle.
329	Bonne.	Bonne.		Inconstante. Nulle.
330	Bonne.	Bonne.	Un essai satisfaisant au 1/4.500.	Inconstante. Nulle.
331	Bonne.	Bonne.	Un essai assez bon au 1/4.500.	Inconstante. Nulle.
332	Bonne.	Bonne.		Bonne. Très inconstante ou nulle. Nulle.
333	Bonne.	Bonne.		Inconstante. Nulle.
335	Bonne.	Bonne.		Bonne. Inconstante. Nulle.
338	Bonne.	Inconstante.	{ Chevaux en immunisation récente. Inconstante.	Bonne. Inconstante. Nulle.
339	Bonne.	Inconstante.	{ Voir expérience particulière.	Nulle. Nulle.
337	Bonne, parfois inconstante.	Inconstante.	Antitoxique pur, immunisation récente.	Bonne. Inconstante. Nulle.
336	Bonne.			

tralisation antitoxique aux dilutions suivantes : 1/500, 1/1.000, 1/1.500.

RÉSULTATS OBTENUS. — L'examen du tableau ci-contre (p. 484) donne une idée d'ensemble de l'activité antitoxique des sérum anti-Vibron septique.

Les sérum n°s 327 à 335 qui donnaient aux titrages de 1927 un pouvoir antitoxique régulièrement constant au 1/500 et, le plus généralement, au 1/1.000 vis-à-vis d'une dose mortelle de toxine accusent aux épreuves plus sévères vis-à-vis d'une dose et demie à deux doses mortelles de toxine (Mars 1928) une bonne neutralisation au 1/500 et une neutralisation inconstante au 1/1.000. Les sérum 333 et 332 de cette série donnent des résultats légèrement inférieurs.

Les sérum 338 et 339 proviennent de chevaux immunisés plus récemment; leur taux de neutralisation, très moyen pour l'ensemble des titrages de l'année précédente, s'est amélioré pour le n° 338 et reste médiocre pour le n° 339, en dépit de l'adjonction de tapioca à la toxine, à partir de Novembre 1927. Tous les sérum précédents sont à la fois antitoxiques et antimicrobiens du fait même de leurs modes différents de préparation.

Le sérum n° 336 préparé par injection de toxine filtrée (antitoxique pur) a manifesté une activité antitoxique plutôt inférieure à celle des sérum mixtes ; il est juste toutefois de préciser que le cheval était en immunisation depuis peu de temps.

Le sérum n° 337 préparé par injections exclusives de corps microbiens formolés (antimicrobien pur) a montré un pouvoir antitoxique très irrégulier, qui était tout à fait inférieur au cours des essais de Mars 1928.

Exception faite pour ce sérum qui mérite une mention particulière, ainsi que pour le sérum n° 329 qui fit l'objet d'une préparation spéciale (Août à Octobre 1927), on peut constater que les modifications apportées dans l'immunisation des chevaux à partir de Novembre 1927 n'ont pas sensiblement modifié leurs propriétés antitoxiques (voir tableau VII).

POUVOIR ANTITOXIQUE D'UN SÉRUM ANTI-VIBRION SEPTIQUE PRÉPARÉ EXCLUSIVEMENT PAR INJECTIONS DE CORPS MICROBIENS FORMOLÉS. — La préparation du cheval n° 337 est commencée le 2 mars 1927

TABLEAU VII. — **Essai comparatif des divers sérums anti-Vibrio septique : pouvoir antitoxique.**Dose d'épreuve de la toxine : une dose et demie à deux doses mortelles ($1/300$, $1/1.000$, $1/1.500$).

SÉRUM N°	PRÉPARATION	DILUTION	TOXINE en cent. cubes	OBSERVATIONS		
				LAPINS INOCULÉS DANS LA VEINE DE L'OREILLE		
327	Toxine centrifugée formolée.	$1/500$ $1/1.000$ $1/1.500$	$3/4$ $3/4$ $3/4$	Guérison : bonne neutralisation. Guérison ; bonne neutralisation. Très malade, guérison : neutralisation limitée.	Sérum antitoxique et antimicrobien.	
328	Toxine centrifugée formolée.	$1/500$ $1/1.000$ $1/1.500$	$3/4$ $3/4$ $3/4$	Guérison : bonne neutralisation. Mort en 10 minutes : neutralisation nulle. Mort en 10 minutes : neutralisation nulle.	Sérum antitoxique et antimicrobien.	
329	Anaculture.	$1/500$ $1/1.000$ $1/1.500$	$3/4$ $3/4$ $3/4$	Guérison : bonne neutralisation. Survie de 5 jours : neutralisation partielle. Mort dans la nuit : légère survie.	Sérum antitoxique et antimicrobien.	
330	Anaculture.	$1/500$ $1/1.000$ $1/1.500$	$3/4$ $3/4$ $3/4$	Guérison : bonne neutralisation. Survie de 24 heures : légère action. Mort dans la nuit : courte survie.	Sérum antitoxique et antimicrobien.	
331	Toxine centrifugée formolée + Sang.	$1/500$ $1/1.000$ $1/1.500$	$3/4$ $3/4$ $3/4$	Guérison : bonne neutralisation. Survie de 24 heures : légère action. Mort en 8 minutes : neutralisation nulle.	Sérum antitoxique et antimicrobien.	
332	Toxine centrifugée	$1/500$ $1/1.000$	$3/4$ $3/4$	Survie de 24 heures : légère action. Mort en 7 minutes : neutralisation nulle.	Sérum antitoxique et antimicrobien.	

				Mort en 40 minutes, neutralisation nulle.
3/4	+ microbes formolés 1/1.500	3/4 3/4 3/4		
335	Toxine centrifugée formolée + Microbes formolés	1/500 1/1.000 1/1.500	3/4 3/4 3/4	Guérison : bonne neutralisation. Très malade, se remet ; neutralisation limite. Survie de quelques heures : légère action.
338	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	1/500 1/1.000 1/1.500	3/4 3/4 3/4	Guérison : bonne neutralisation. Mort en 10 minutes ; neutralisation nulle. Mort en 15 minutes ; neutralisation nulle.
339	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	1/500 1/1.000 1/1.500	3/4 3/4 3/4	Survie de quelques heures : légère action. Mort en 10 minutes ; neutralisation nulle. Mort en 7 à 8 minutes ; neutralisation nulle.
337	Corps microbiens formolés.	1/500 1/1.000 1/1.500	3/4 3/4 3/4	Mort en 5 minutes ; neutralisation nulle. Survie de 2 jours 1/2 : légère action. Mort en 10 minutes ; neutralisation nulle.
336	Toxine filtrée formolée.	1/500 1/1.000 1/1.500	3/4 3/4 3/4	Guérison : neutralisation. Survie : légère action. Mort en 40 minutes ; neutralisation nulle.
Témoins		"	3/4 3/4 3/4	Mort en 7 minutes. Mort en 2 h. 25. Mort en 7 minutes.
Témoins		"	1/2	Très malade, se remet. Mort le lendemain.
		"	1/10	Très malade, se remet.

Cet animal reçoit par voie sous-cutanée des doses croissantes de microbes formolés, émulsionnés dans de l'eau physiologique :

Le 2 mars	1 centigrammes.
Le 9 mars	5 —
Le 16 mars	10 —
Le 23 mars	10 —
Le 30 mars	10 —
Le 6 avril	10 —
Le 13 avril	10 —
Le 21 mai	10 —
Le 25 juin	10 —

1 milligramme de corps microbiens formolés, pesés secs, correspond à 3 c. c., 5 environ d'une culture de 24 heures en bouillon, de Vibrio septique. Le cheval n° 337 a donc reçu, du 2 mars au 15 juin, des quantités de corps microbiens formolés (760 milligrammes) correspondant à 3 litres environ de culture.

Un titrage effectué, fin mai, montre que le sérum de ce cheval protège au 1/500 un lapin de 2 kilogrammes contre 3/4 de centimètre cube d'une toxine Vibrio septique qui, à cette dose, tue les lapins témoins entre dix à douze heures.

Une nouvelle épreuve, plus sévère, faite en juin avec une toxine plus forte permet d'obtenir la neutralisation complète de 1/4 de centimètre cube de cette toxine (dose tuant les témoins en dix minutes) par 1/500 de centimètre cube du sérum. A ce même titrage, les sérum thérapeutiques du laboratoire protégeaient les lapins contre la même dose de toxine : les uns au 1/1.000, les autres au 1/500. Il était donc curieux de remarquer que nous étions arrivés à cette époque à obtenir un sérum antitoxique anti-Vibrio septique, sensiblement équivalent à la moyenne de nos sérum thérapeutiques par la seule injection de corps microbiens formolés.

Les chevaux ayant été laissés au repos en Août, pendant la période des chaleurs, la préparation du cheval n° 337 est reprise en Septembre par injections mensuelles, avec les chevaux de sa série, de 10 centigrammes de microbes formolés (correspondant à 300 ou 400 centimètres de culture). Deux titrages successifs effectués en Octobre dénotent une baisse importante du pouvoir antitoxique : le sérum ne protège plus que très irrégulièrement au 1/500. En Décembre, l'activité antitoxique remonte, donnant même une bonne neutralisation

au 1/1.000, pour retomber au moment de nos essais de Mars 1928 à des taux inférieurs au 1/500.

L'ensemble de ces expériences montre : d'une part, la possibilité d'obtenir un sérum antitoxique par la seule injection de corps microbiens formolés ; mais, d'autre part, l'irrégularité de l'activité antitoxique de ce sérum.

POUVOIR ANTITOXIQUE DU SÉRUM N° 329, PRÉPARÉ PAR INJECTIONS SIMULTANÉES DE TOXIQUE PURE SOUS LA PEAU ET DE CORPS MICROBIENS VIVANTS DANS LA VEINE. — Le désir de posséder au laboratoire un sérum anti-Vibrio septique type doué de propriétés anti-toxiques aussi bien que de propriétés antimicrobiennes très actives en vue de recherches expérimentales (neutralisation, agglutination, identification de souches diverses), ainsi que l'intérêt de trouver un mode de préparation particulièrement efficace des sérum thérapeutiques, nous a conduits à reprendre un procédé d'immunisation qui avait donné à l'un de nous de remarquables résultats au début de la préparation des sérum antigangréneux.

Ce procédé consiste à inoculer la culture de Vibrio septique totale au même cheval : la culture de vingt-quatre heures, en bouillon, est centrifugée très soigneusement, jusqu'à limpide parfaite du liquide. La toxine ainsi débarrassée presque totalement des microbes est injectée à l'animal par voie sous-cutanée. Le culot microbien repris en eau physiologique est inoculé, le même jour, par voie veineuse.

Le cheval n° 329 étant déjà hyperimmunisé de longue date vis-à-vis du Vibrio septique, nous avons pu conduire cette préparation particulière assez activement, les doses de culture virulente (toxine centrifugée non atténuée sous la peau, culot de microbes vivants injecté intégralement dans la jugulaire) étant les suivantes :

17 août 1927	20 cent. cubes.
24 août 1927	20 —
31 août 1927	50 —
7 septembre 1927	100 —
14 septembre 1927	200 —
21 septembre 1927	200 —
28 septembre 1927	300 —
5 octobre 1927	400 —

L'injection intraveineuse de microbes précédant de quelques

TABLEAU VIII. — Essai comparatif des divers sérum anti-Vibron-septique : pouvoir anti-infectieux.

Dose d'épreuve : DEUX DOSES MORTELLES ENVIRON ($1/200 + 1/1.000$).

SÉRUM N°	PRÉPARATION	DILUTION du serum	DOSE D'ÉPREUVE (coulé en centre de la cuisse)	COBAYES INOCULÉS PAR VOIE INTRAMUSCULAIRE : CUISSE			OBSERVATIONS
				CUISSON	MORT	GUÉRISON	
327	Toxine centrifugée formolée.	1/200	1/20	Guérison : neutralisation complète.			Sérum antitoxique et antimicrobien.
		1/300	1/20	Guérison : neutralisation complète.			
		1/500	1/20	Guérison avec légère induration locale : neutralisation complète.			
		1/750	1/20	Mort , survie de 24 heures : neutralisation incomplete.			
328	Toxine centrifugée formolée.	1/1.000	1/20	Guérison avec lésions locales : neutralisation incomplete.			Sérum antitoxique et antimicrobien.
		1/200	1/20	Guérison : neutralisation complète.			
		1/300	1/20	Guérison : neutralisation complète.			
		1/500	1/20	Guérison : neutralisation complète.			
329	Anaculture.	1/750	1/20	Guérison de 30 p. 400 des cobayes : neutralisation incomplete ou aléatoire.			Sérum antitoxique et antimicrobien.
		1/1.000	1/20	Mort , survie de 24 heures : neutralisation incomplete ou aléatoire.			
		1/200	1/20	Guérison : neutralisation complète.			
		1/300	1/20	Guérison : neutralisation complète.			
330	Anaculture.	1/500	1/20	Guérison : neutralisation complète.			Sérum antitoxique et antimicrobien.
		1/750	1/20	Guérison : neutralisation complète.			
		1/1.000	1/20	Guérison avec lésions : neutralisation incomplete.			
		1/200	1/20	Guérison : neutralisation complète.			

antimicrobien.

Guérison de 50 p. 400 des cobayes ;
neutralisation aléatoire.
Mort en 24 heures : neutralisation nulle.

formolée + Sang.

332

Toxine centrifugée
formolée + Sang.1/750 1/20
1/4.000 1/20

Guérison : neutralisation complète.
Guérison : neutralisation complète.
Guérison : neutralisation complète.
Survie de 24 heures : neutralisation incomplète.
Mort en 24 heures : neutralisation nulle.

Sérum antitoxique et
antimicrobien.Toxine centrifugée
formolée
+ Microbes formolés1/200 1/20
1/300 1/20
1/500 1/20
1/750 1/20
1/4.100 1/20

Guérison : neutralisation complète.
Guérison : neutralisation complète.
Guérison : neutralisation complète.
Guérison de 50 p. 400 des cobayes ;
neutralisation aléatoire.
Légère survie : neutralisation incomplète.

Toxine centrifugée
formolée
+ Microbes formolés1/200 1/20
1/300 1/20
1/500 1/20
1/750 1/20
1/4.000 1/20

Guérison : neutralisation complète.
Guérison : neutralisation complète.
Guérison : neutralisation complète.
Guérison : neutralisation complète.
Mort dans la nuit : neutralisation nulle.

Toxine centrifugée
formolée + Tapioca.1/200 1/20
1/300 1/20
1/500 1/20
1/750 1/20
1/4.000 1/20

Guérison : neutralisation complète.
Guérison : neutralisation complète.
Guérison : neutralisation complète.
Guérison de 50 p. 400 des cobayes ; neutralisation aléatoire
ou incomplète.
Survie de 24 heures : neutralisation aléatoire
ou incomplète.

Sérum antitoxique et
antimicrobien.Sérum antitoxique et
antimicrobien.Sérum antitoxique et
antimicrobien.

SERUM N°	PRÉPARATION	DILUTION de serum	DOSAGE D'EPREUVE (cellulite tolérée) en cent. cubes	COBAYES INOCULÉS PAR VOIE INTRAMUSCULAIRE : CHIUSSE		OBSERVATIONS
				Guérison : neutralisation complète. Guérison : neutralisation complète. Guérison : neutralisation complète. Mort en 26 à 30 heures : neutralisation nulle. Mort en 24 heures : neutralisation nulle.		
339	Toxine centrifugée formolée + Tapioca	1/200 1/300 1/500 1/750 1/1.000	1/20 1/20 1/20 1/20 1/20	Guérison avec légère induration de la cuisse : neutralisation incomplète. Guérison avec lesions : neutralisation incomplète. Mort en 20 heures : neutralisation nulle. Mort dans la nuit : neutralisation nulle. Mort en 24 heures : neutralisation nulle.	Sérum antitoxique et antimicrobien.	Sérum antitoxique.
337	Corps microbiens formolés.	1/200 1/300 1/500 1/750 1/1.000	1/20 1/20 1/20 1/20 1/20	Guérison : neutralisation complète. Guérison : neutralisation complète. Guérison : neutralisation complète. Mort de 50 p. 100 des cobayes avec lesions : neutralisation atalante et incomplète. Mort avec légère survie : neutralisation nulle.	Sérum antimicrobien.	Sérum antitoxique.
336	Toxine filtrée formolée.	1/200 1/300 1/750 1/1.000	1/20 1/20 1/20 1/20	Mort en 24 heures. Mort en 24 heures. Mort en 36 heures.	Mort en 24 heures.	1/20 de centimètre cube reprisale, comme dose d'épreuve, en viron deux doses mortelles.
Témoins		" " "	1/20 1/20 1/20		Mort en 24 heures.	
			1/30			
			1/40	Guérison précaire avec lesions graves. Mort de 50 p. 100 des cobayes.		

heures l'injection sous-cutanée de toxine, même aux doses élevées, les réactions du cheval (générales ou locales) n'étaient pas inquiétantes, sous réserve de procéder lentement à l'injection intraveineuse de l'émulsion microbienne.

Ce procédé nous a permis d'obtenir un bon sérum antitoxique neutralisant une dose mortelle de toxine au 1/1.000 et au 1/1.500, à la fin de l'année 1927. Ce taux de neutralisation est encore inférieur à celui obtenu antérieurement à une préparation analogue par Weinberg (1/2.000, 1/3.000) différence que l'on peut attribuer au fait que le cheval n° 329 était déjà hyper-immunisé par des cultures formolées et n'offrait plus à notre expérience les réactions d'un organisme vierge.

L'immunisation de ce même cheval, continuée à partir de Novembre 1927 avec des anacultures nous montre, aux titrages de Mars 1928, le retour de son pouvoir antitoxique au taux moyen de l'ensemble de nos sérum : 1/500 à 1/1.000.

POUVOIR ANTI-INFECTIEUX.

SOUCHE UTILISÉE. — La souche de Vibrio septique, qui sert au laboratoire, tant pour les recherches expérimentales que pour l'immunisation des chevaux, est douée d'un bon pouvoir pathogène pour le cobaye, par injection intramusculaire dans la cuisse.

Inoculée par cette voie à des cobayes de 250 à 350 grammes, une culture en bouillon glucosé de vingt à trente-six heures, provoque la mort de l'animal avec des lésions gangrénées de la cuisse, et un œdème crépitant envahissant des régions inguinales, scrotales et abdominales, à la dose de 1/10 à 1/30 de centimètre cube.

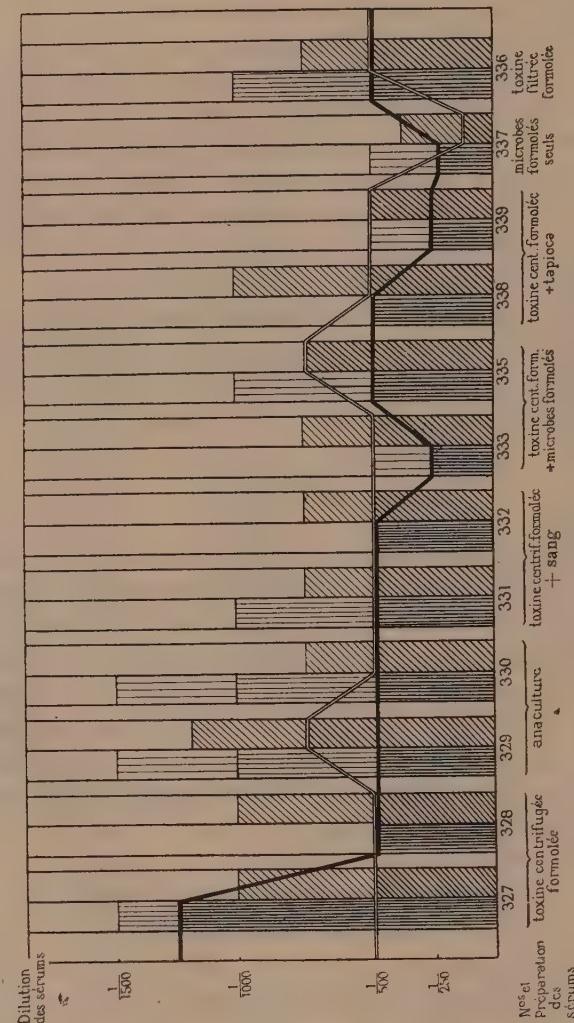
On exalte facilement la virulence de cette souche, au point qu'elle tue au 1/30 et même au 1/40 de centimètre cube.

C'est avec cette souche à virulence exaltée que nous avons fait nos essais du pouvoir anti-infectieux des sérum vis-à-vis d'échantillons dont la dose minima mortelle variait du 1/30 au 1/40. Notre dose d'épreuve de 1/20 centimètre cube atteignait sensiblement le double de la dose minima mortelle.

NEUTRALISATION. — Elle a été effectuée dans les conditions générales de technique déjà mentionnées : neutralisation par

contact de la culture avec les diverses dilutions du sérum prolongé une heure à l'étuve ou à la température du laboratoire.

TABLEAU IX. — Pouvoirs antitoxique et anti-infectieux des sérums anti-Vibrio-septique (1)



Pouvoir antitoxique (hachures verticales, trait plein).

Pouvoir anti-infectieux (hachures diagonales, trait double).

Neutralisation complète, hachures serrées; incomplete ou défaillante, hachures espacées.

L'animal d'expérience a été le cobaye, les animaux (250 à 350 grammes) étant groupés par lots aussi homogènes que possible.

(1) *Doses d'épreuve* : Toxine, une dose et demie à deux doses mortelles; culture, deux doses mortelles environ.

TABLEAU X. — Pouvoir agglutinant des sérums anti-Vibrio septique.

SÉRUM N°	PRÉPARATION	AU DEJA									
		1/100.000	1/50.000	1/35.000	1/25.000	1/20.000	1/10.000	1/7.000	1/5.000	1/2.000	1/1.000
327	Toxine centrifugée formolée.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
328	Toxine centrifugée formolée.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
329	Anaculture.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
330	Anaculture.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
331	Toxine centrifugée formolée + Sang.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
332	Toxine centrifugée formolée + Sang.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
333	Toxine centrifugée formolée + Microbes formolés	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
335	Toxine centrifugée formolée + Microbes formolés.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
338	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
339	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
337	Corps microbiens formolés.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	?
336	Toxine filtrée formolée.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+

L'épreuve est faite par inoculation intramusculaire dans la cuisse du mélange et par comparaison avec une série de cobayes témoins inoculés avec la culture pure.

RÉSULTATS. — Une première série d'essais avec des dilutions de sérum variant du 1/200 au 1/500 nous a montré que presque tous nos séums neutralisaient au 1/500.

Une deuxième série, poussée aux taux de 1/750 et de 1/1.000, nous permettait d'atteindre sensiblement pour tous nos échantillons la limite de leur pouvoir anti-infectieux, vis-à-vis d'une dose d'épreuve voisine du double de la dose minima mortelle de culture.

Au 1/750 et au 1/1.000, la mort du cobaye ou l'examen des lésions (évolution, induration et lésions persistantes) permettaient d'établir la valeur comparée des 12 échantillons de sérum anti-Vibron septique.

L'examen du tableau VIII résumant les principaux résultats, ainsi que du schéma IX, fait ressortir l'équivalence de l'activité de presque tous les séums, dont le pouvoir anti-infectieux varie de 1/500 (neutralisation complète) à 1/750 (neutralisation incomplète, ou efficace chez 50 p. 100 seulement des cobayes).

Un pouvoir anti-infectieux légèrement supérieur s'est manifesté pour deux séums préparés par injections de toxine et de microbes :

Le n° 329 dont nous avons signalé antérieurement la préparation particulière d'Août à Octobre 1927 et avec des anacultures à partir de Novembre.

Le n° 335 dont le pouvoir antitoxique n'offrait pourtant, à un titrage parallèle, aucune activité particulière. Par contre, la moyenne des titrages de l'année 1927 donnait ce sérum comme l'un de nos plus actifs.

Le n° 327 (pouvoir antitoxique élevé) accuse un pouvoir anti-infectieux encore net quoique inconstant au 1/1.000.

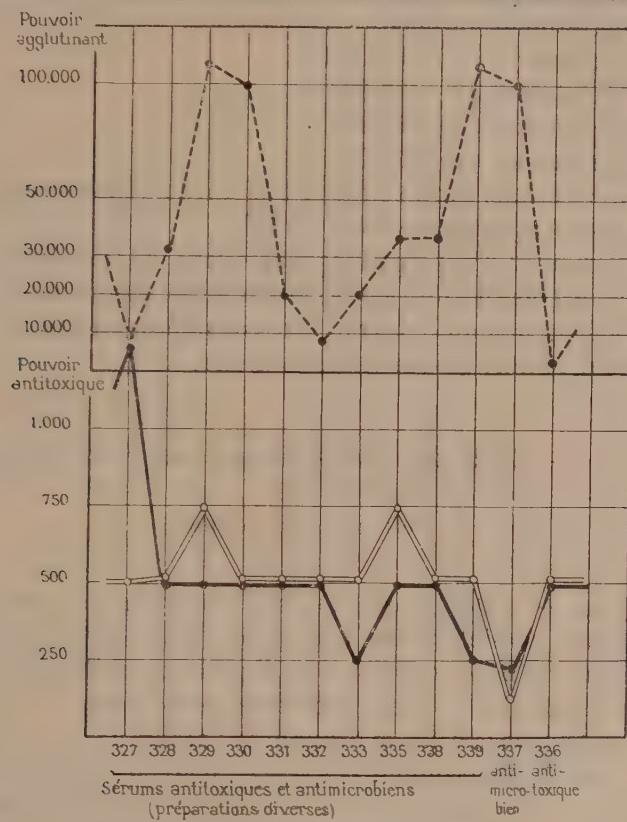
L'insuffisance du sérum n° 339 au point de vue antitoxique n'entraîne pas corrélativement de diminution de son pouvoir anti-infectieux. A noter que ce sérum est doué d'un fort pouvoir agglutinant (au delà du 1/100.000).

La faiblesse du pouvoir anti-infectieux du sérum purement

antimicrobien n° 337 (préparation par les microbes formolés seuls) va de pair avec la faiblesse de son pouvoir antitoxique, en dépit pourtant d'un fort pouvoir agglutinant (1/100.000).

En somme, aucune de ces constatations n'entraîne de con-

TABLEAU XI. — Comparaison du pouvoir agglutinant et des pouvoirs antitoxique et anti-infectieux des sérum anti-Vibron septique.



viction en faveur de tel ou tel procédé de préparation des sérums anti-Vibron septique. Leur pouvoir anti-infectieux est très sensiblement équivalent; cependant, les sérums préparés avec le mélange toxine et microbes sont souvent supérieurs. Un autre fait mérite d'être souligné : l'insuffisance très nette du pouvoir anti-infectieux du sérum exclusivement préparé avec des corps microbiens (pouvoir antitoxique faible) en dépit de son pouvoir agglutinant très élevé.

POUVOIR AGGLUTINANT.

Les sérum anti-Vibrio septique présentent un pouvoir agglutinant notablement supérieur aux sérum anti-*perfringens* et anti-histolytique. Sur nos 12 sérum :

- 2 agglutinent au delà du 1/100.000.
- 2 agglutinent au 1/100.000.
- 3 agglutinent au 1/35.000.
- 2 agglutinent au 1/20.000.
- 2 agglutinent au 1/7.000.

Ces 11 sérum sont, soit à la fois antitoxiques et antimicrobiens, soit antimicrobien pur (n° 337).

Le sérum n° 336 préparé par injections de toxines formolées filtrées, privées de tout corps microbiens, agglutine lui-même au 1/2.000, bien qu'il devrait être considéré, du fait de sa préparation, comme purement antitoxique.

III. — Étude des divers sérum anti-histolytiques.

POUVOIR ANTI-TOXIQUE.

TOXINE. — Elle est obtenue par centrifugation aussi complète que possible d'une culture de vingt-quatre heures, en bouillon, du *B. histolyticus*. Le liquide complètement clarifié ne contient que de rares éléments microbiens.

Inoculé dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin de taille moyenne (2 kilogrammes à 2 kilogr. 500), il provoque la mort après une crise généralement violente en cinq à dix minutes et à des doses variant de 1/2 cent. cube à 1/10 de centimètre cube.

Bien que l'on puisse rencontrer exceptionnellement des toxines histolytiques capables de provoquer des troubles graves et même de tuer le lapin au 1/20^e de centimètre cube, nous considérons comme de très bonnes toxines celles qui sont mortelles au 1/10 de centimètre cube. L'activité moyenne de celles qui ont servi à nos expériences variait de 1/2 à 1/4, 1/5 de centimètre cube.

SÉRUMS n°*	PRÉPARATION	DILUTION	TOXINE en cent. dilués	LAPINS INOCULÉS DANS LA VEINE DE L'OREILLE	OBSERVATIONS
341	Toxine centrifugée formolée.	1/250 1/500	1/2 1/2	Mort, survie de 40 à 42 heures. Mort , survie de 4 à 5 heures.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
343	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	1/250 1/500	1/2 1/2	Mort, survie de 24 heures. Mort , survie de 4 à 5 heures.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
345	Anaculture.	1/250 1/500	1/2 1/2	Mort, survie de 10 à 12 heures. Mort , survie de 3 à 4 heures.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
342	Toxine filtrée formolée.	1/250 1/500	1/2 1/2	Mort, survie de quelques heures. Mort en 10 minutes.	Sérum antitoxique.
Témoins.	{	»	1/2	Mort en 5 à 10 minutes après crise violente. Mort en 5 à 10 minutes après crise violente. Mort en 5 à 10 minutes après crise violente.	

Pouvoir agglutinant des sérums anti-histolytiques.

SÉRUMS n°*	PRÉPARATION	1/100	1/250	1/500	1/1.000	1/3.000	1/5.000	1/7.000	1/10.000	1/20.000
341	Toxine centrifugée formolée.	+	+	+	+	+	+	+	?	?
343	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	+	+	+	+	+	+	+	+	?
345	Anaculture.	+	+	+	+	+	+	+	?	?
342	Toxine filtrée formolée.	+	+	+	+	+	+	?		

L'action de ces toxines est généralement brutale ; la crise qu'elles déterminent est le plus souvent immédiate ou très proche de l'injection et violente. La mort survient en quelques minutes.

La détermination de la dose minima mortelle est souvent délicate, car cette dose minima provoque elle-même des symptômes violents, tandis qu'une dose très légèrement inférieure est supportée par l'animal presque sans troubles apparents.

Il n'y a pas avec la toxine du *B. histolytique* (du moins pour la souche utilisée dans nos expériences) une graduation parallèle entre la gravité des symptômes et la dose de toxine injectée, permettant aux expérimentateurs d'apprecier le voisinage de la dose minima mortelle. Ce passage brusque d'une dose apparemment inoffensive à une dose, très peu supérieure, brutalement mortelle permettrait de se demander quelle part revient dans ces accidents à la fonction toxique proprement dite ou au choc consécutif à l'injection intraveineuse ? La neutralisation très efficace obtenue autrefois par Weinberg à des taux très élevés par l'emploi de sérum anti-toxiques homologues indiquerait pourtant qu'il s'agit bien d'une action toxique sur les centres nerveux. Notre but n'est pas actuellement de répondre à cette question touchant plus particulièrement le mode d'action pathogène de la toxine du *B. histolytique* ; mais il importait de signaler cette particularité qui rend les titrages antitoxiques des sérum très délicats et souvent difficiles à interpréter, en raison de la violence des crises que détermine la dose minima mortelle elle-même.

EPRUVES DE NEUTRALISATION. — En suivant la technique générale courante, injection intraveineuse au lapin (2 kilogrammes à 2 kilogr. 500) du mélange sérum et toxine laissé pendant une heure à la température de l'étuve ou du laboratoire, nous n'avons observé que des neutralisations médiocres, ou en tous cas très inférieures à celles obtenues avec les anciens sérum, antérieurement à l'emploi pour leur préparation des toxines formolées.

Aussi bien au cours de l'année 1927 (titrage périodique de sérum) que dans les essais d'amélioration de la préparation de ces séums, l'action antitoxique des séums anti-his-

tolytiques s'est manifestée d'une manière précaire ou incomplète.

Dans quelques cas, la crise mortelle, qui emporte les témoins en cinq à dix minutes était purement et simplement différée de quelques instants (un quart d'heure à une heure), mais conservait toute sa violence. Dans la majorité des cas, la neutralisation partielle de la toxine se traduisait par une survie plus longue pouvant aller de douze à vingt-quatre heures, la crise étant d'autant moins accusée que la survie était plus longue (Voir tableau XII).

C'est exceptionnellement que nous avons rencontré une neutralisation complète de la toxine par le sérum assurant une survie définitive aux lapins, avec absence complète de manifestations toxiques (amaigrissement, paralysies).

RÉSULTATS OBTENUS. — Les sérums 311, 313 et 315 (sérum à la fois antitoxiques et antimicrobiens) donnent une neutralisation partielle au 1/250, avec survie de dix, douze à vingt-heures. Au 1/500, la survie ne dépasse guère quelques heures.

Le sérum purement antitoxique n° 312 ne retarde pas la mort des animaux, par rapport aux témoins, au 1/500, et n'assure qu'une brève survie au 1/250. C'est dire qu'au point de vue autitoxique il est encore inférieur aux sérums précédents.

En présence de ces résultats, nous nous sommes demandé si l'insuffisance de neutralisation résultait de l'insuffisance de la dose de sérum ; aussi avons-nous essayé d'augmenter la proportion de sérum dans le mélange. Les essais de neutralisation au 1/100 et au 1/50 ne nous ont pas donné de résultats très supérieurs.

Bien plus, au cours de ces essais, nous avons observé parfois des résultats absolument paradoxaux, les lapins inoculés avec le mélange toxine-sérum mourant plus rapidement et avec des crises plus violentes que les témoins. Tout se passait alors comme si le mélange toxine-sérum formait un complexe dont le dédoublement en masse au niveau des capillaires cérébraux provoquerait, soit une action toxique, soit un choc, déterminant des symptômes encore plus néfastes que le transport de la même dose de toxine vers les centres nerveux à

TABLEAU XIII. — Essai comparatif des divers sérums anti-histolytiques : pouvoir anti-infectieux.

Dose d'épreuve de culture : une dose minima mortelle.

SÉRUMS n°	PRÉPARATION	DILUTION	DOSE D'ÉPREUVE (culture totale) en cent. cubes)	COBAYES INOCULÉS PAR VOIE INTRAMUSCULAIRE : CUISSE		OBSERVATIONS
				OBSERVATIONS		
341	Toxine centrifugée formolée.	1/10	1/30	Guerison sans lésions : neutralisation complète.		
		1/50	1/30	Guerison sans lésions : neutralisation complète.		
		1/100	1/30	Guerison sans lésions : neutralisation complète.		
		1/200	1/30	Petite lésion locale, guérison totale : neutralisation complète.	Sérum antitoxique et antimicrobien.	
		1/300	1/30	Grosse réaction de la cuisse, guérison avec induration locale : neutralisation incomplète, assez bonne.		
		1/500	1/30	Mort en 24 heures : neutralisation nulle.		
343	Toxine centrifugée formolée + Tapioca.	1/1000	1/30	Mort en 24 heures : neutralisation nulle.		
		1/10	1/30	Guerison sans lésions : neutralisation complète.		
		1/50	1/30	Guerison, pas de lésions : neutralisation complète.		
		1/100	1/30	Guerison, pas de lésions : neutralisation complète.		
		1/200	1/30	Guerison, pas de lésions : neutralisation complète.		
		1/300	1/30	Lésion locale, puis mort avec survie de 3 jours : neutralisation incomplète (survie).	Sérum antitoxique et antimicrobien.	
		1/500	1/30	Lésion grave (histolyse de la cuisse), mort avec survie de 48 heures : neutralisation incomplète (survie).		

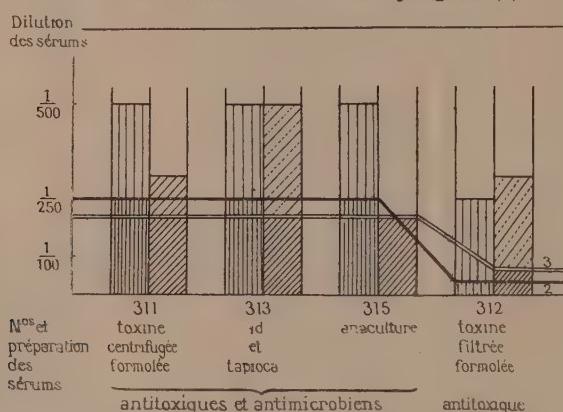
345	Anaculture.	1/30	1/30	Guerison sans lésions : neutralisation complète.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
		1/400	1/30	Guérison sans lésions : neutralisation complète.	
		1/200	1/30	Induration de la cuisse, guérison : neutralisation complète.	
		1/300	1/30	Mort en 24 heures : neutralisation insignifiante ou nulle.	
		1/500	1/30	Mort en 48 heures : neutralisation insignifiante ou nulle.	
		1/1.000	1/30	Mort dans la nuit : neutralisation insignifiante ou nulle.	
342	Toxine filtrée formolée.	1/10	1/30	Guérison sans lésions : neutralisation complète ou satisfaisante.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
		1/30	1/30	Lésion locale, guérison : neutralisation complète ou satisfaisante.	
		1/100	1/30	Lésions locales, survie de 48 heures environ, mort : neutralisation incomplète (survie).	
		1/200	1/30	Lésions locales, survie de 48 heures environ, mort : neutralisation incomplète (survie).	
		1/300	1/30	Mort dans la nuit : neutralisation nulle.	
		1/500	1/30	Mort dans la nuit : neutralisation nulle.	
	Témoins	1/1.000	1/30	Mort dans la nuit : neutralisation nulle.	{Dose minima mortelle 1/30. 1/40 de centimètre cube entraîne une lyse complète de la cuisse, mais pas toujours la mort du sujet.
		2	1/20	Mort dans la nuit.	
		*	1/30	Mort en 36 heures.	
		*	1/30	Mort en 24 heures.	
		*	1/30	Mort dans la nuit.	
		*	1/30	Mort dans la nuit.	

l'état libre. Il s'agit évidemment d'une hypothèse ; mais il nous a paru intéressant, quoique ne pouvant les expliquer, de signaler ces observations paradoxales. Leur première constatation pouvait faire croire à une erreur matérielle dans les dilutions ou à une faute de technique, alors que leur renouvellement nous a obligé à accepter le fait comme un phénomène biologique.

POUVOIR ANTI-INFECTIEUX.

SOUCHE UTILISÉE. — Nous avons recherché le pouvoir anti-infectieux des sérum vis-à-vis de la même souche utilisée

TABLEAU XIV. — Pouvoir antitoxique et pouvoir anti-infectieux des divers séums anti-histolytiques (1).



Pouvoir antitoxique (hachures verticales, trait plein).

Pouvoir anti-infectieux (hachures diagonales, trait double).

Neutralisation complète, hachures serrées; incomplète, hachures moyennes; douteuse, échecs ou survies de durée variable, hachures larges.

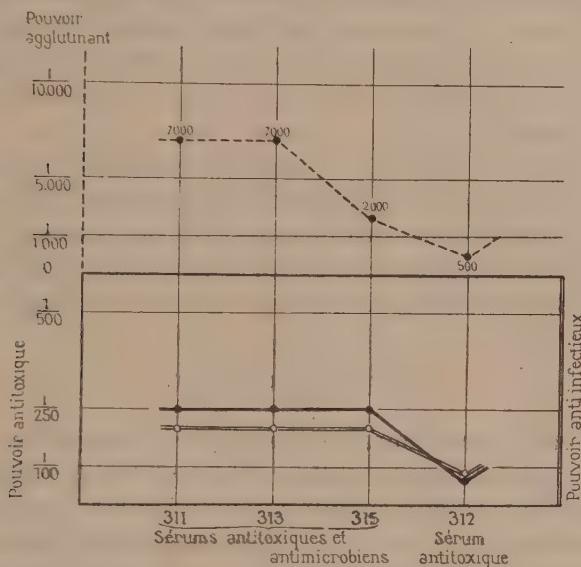
pour la production de la toxine des recherches précédentes, souche du laboratoire servant à l'immunisation des chevaux comme aux études expérimentales. Une culture de vingt-quatre heures en bouillon de cette souche de *B. histolyticus* provoque des lésions effroyables de lyse des tissus, en injection intramusculaire dans la cuisse du cobaye à des doses faibles, 1/20 à 1/40, parfois même au cours de passages *in vivo* au 1/50 de centimètre cube.

(1) Dose d'épreuve : Toxine, culture, une dose minima mortelle.

NEUTRALISATION. — Dans nos essais de détermination du pouvoir anti-infectieux, nous avons recherché des échantillons particulièrement virulents de cette souche afin d'obtenir non seulement des lésions locales, mais surtout la mort aussi régulière que possible des témoins.

L'animal d'expérience étant le cobaye, nous avons pratiqué

TABLEAU XV. — Comparaison du pouvoir agglutinant et des pouvoirs antitoxique et anti-infectieux des sérums anti-histolytiques.



nos épreuves avec des cultures tuant tous les témoins aux doses de 1/15, 1/20 et même 1/30 de centimètre cube.

Nous évitions ainsi d'obtenir des survies avec élimination complète des muscles lysés de la cuisse, l'appréciation de la gravité relative des lésions étant presque impossible lorsqu'il s'agit de délabrements locaux aussi graves que ceux provoqués par le *B. histolyticus*.

La technique de neutralisation préalable *in vitro* était celle dont nous avons déjà fait mention.

L'inoculation d'épreuve était pratiquée en pleine masse musculaire dans la cuisse du cobaye.

RÉSULTATS OBTENUS. — En dépit de leur faible pouvoir anti-

toxique, les sérum antihistolytiques se sont montrés doués de bonnes propriétés infectieuses. (Tableau XIII).

Les sérum 311, 313, 315 (à la fois antitoxiques et antimicrobiens) neutralisent parfaitement une dose mortelle du *B. histolyticus* jusqu'au 1/200. Jusqu'au 1/500, leur action, quoique irrégulière et assez précaire, se manifeste souvent par des survies appréciables pouvant atteindre plusieurs jours. La neutralisation au 1/200 doit être considérée comme atteignant un taux très satisfaisant, puisqu'elle atteint sensiblement le taux qui exprime le pouvoir anti-infectieux moyen des sérum anti-*perfringens*, alors que les lésions locales du *B. perfringens* sont toujours beaucoup moins sévères que celles dues au *B. histolyticus*.

Le sérum 312 préparé avec de la toxine filtrée formolée (sérum antitoxique) ne jouit pas de la même valeur au point de vue anti-infectieux. Au delà du 1/50, on ne peut compter sur une neutralisation complète; à partir du 1/300, la mort survient dans des délais comparables à ceux des témoins.

POUVOIR AGGLUTINANT.

Le *B. histolyticus* fournit en présence de son sérum homologue des agglutinations nettes, mais relativement discrètes, si on les compare aux agglutinations massives obtenues avec le Vibrio septique ou le *B. sporogenes*. L'agglutination du *B. histolyticus* se rapprocherait plutôt de celle du *B. perfringens*, au point de vue macroscopique.

Les taux obtenus ont été les suivants :

Sérum antitoxiques et antimicrobiens.

311	1/7.000
313	1/7.000
315	1/2.000

Sérum antitoxique.

312	1/500 seulement.
---------------	------------------

IV. — Étude des divers sérum anti-œdématiens.

POUVOIR ANTITOXIQUE.

TOXINE. — Au cours des années 1927 et 1928, nous avons travaillé avec différentes souches des *B. œdematiens*. Bien qu'ayant été l'objet de nombreux passages *in vivo* (inoculation intramusculaire au cobaye), la souche utilisée couramment au laboratoire en 1926 a perdu une partie de son pouvoir toxique, tout en conservant un pouvoir infectieux élevé. Cette souche tuait couramment un cobaye de 300 grammes, en injection intramusculaire dans la cuisse, à la dose de 1/4 à 1/10 de centimètre cube d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures ; nous avons noté au cours des passages sur cobayes des doses minima mortelles atteignant 1/20, parfois 1/30, exceptionnellement 1/40 de centimètre cube, ce qui représente une très bonne virulence pour les animaux de laboratoire. Par contre, la même souche ensemencée en bouillon ne donnait des toxines ne tuant la souris qu'au taux de 1/250 à 1/500, alors que son pouvoir toxique initial variait de 1/1.000 à 1/1.500. Les passages en série, soit par milieux (milieux propices à la production de la toxine au pyruvate de soude, ensemencements successifs rapprochés), soit *in vivo*, ne nous ont pas permis d'obtenir de pouvoir toxique moyen régulièrement supérieur au 1/300 (titrage sur souris).

Une souche datant de 1919, *Oed* (DEL) réensemencée nous a donné d'emblée, avec des cultures plutôt « maigres » et un pouvoir infectieux moindre (dose mortelle pour le cobaye : 1/2 à 1/10 de centimètre cube) une excellente toxine. Cette toxine tuait régulièrement les souris, par injections sous-cutanées à la dose de 1/2.000, assez fréquemment au 1/2.500 et irrégulièrement au 1/3.000. Dès les premiers repiquages ce pouvoir toxique a baissé et, au moment où nous utilisions cette souche pour essayer le pouvoir antitoxique de nos sérums, elle donnait une toxine tuant la souris à des dilutions de 1/1.000 à 1/1.500, taux qui caractérise encore, pour le *B. œdematiens*, une très bonne toxine.

TABLEAU XVI. — Essai comparatif des divers sérums anti-œdématisens : pouvoir anti-toxique.

DOSE D'ÉPREUVE DE TOXINE : CENT POSES MORTELLES ($1/4.000$, $1/2.000$, $1/3.000$).

SÉRUM n°	PRÉPARATION	MOITIÈRE	DOSSE D'ÉPREUVE en cent. gouttes	SOURIS INOCULÉES par voie sous-cutanée		OBSERVATIONS
				1/100	1/10	
442	Toxine centrifugée formolée.		1/1.000 1/2.000 1/3.000	1/10 1/10 1/10	Neutralisation, pas d'accidents. Neutralisation, pas d'accidents. Survie de 24 heures, mort.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
443	Toxine centrifugée formolée.		1/1.000 1/2.000 1/3.000	1/10 1/10 1/10	Neutralisation. Survie de 24 heures, mort. Mort dans la nuit.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
448	Toxine centrifugée formolée.		1/1.000 1/2.000 1/3.000	1/10 1/10 1/10	Neutralisation (quelques morts avec survie). Mort dans la nuit. Mort dans la nuit.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
421	Anaculture.		1/1.000 1/2.000 1/1.000	1/10 1/10 1/10	Neutralisation. Survie de 24 heures, mort. Mort dans la nuit.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
422	Anaculture		1/1.000 1/2.000 1/3.000	1/10 1/10 1/10	Neutralisation. Neutralisation. Survie de 24 heures, mort.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
423	Anaculture.		1/1.000 1/2.000 1/3.000	1/10 1/10 1/10	Neutralisation ou survie temporaire. Mort dans la nuit. Mort dans la nuit.	Sérum antitoxique et antimicrobien.
420	Toxine filtrée formolée.		1/250 1/500	1/10 1/10	Neutralisation. Mort dans la nuit.	Sérum antitoxique pur.

TABLEAU XVII. — Pouvoir anti-infectieux des sérums anti-oedematisens.

A. — EXEMPLE DE TIPIAGE AVEC UNE DOSE D'ÉPREUVE DE CULTURE VOISINE DE LA DOSE MINIMA MORTELLE (DU $1/4.000$ AU $1/20.000$).

SÉRUM n°	DILUTION	DOSE D'ÉPREUVE (en centi-cubes)	CULTURE TOXIQUE (en centi-cubes)	COBAYES INOCULÉS DANS LA CUISSE (voie intramusculaire)		OBSERVATIONS
				Examen au bout de 24 heures	Examen au bout de 2 à 3 jours	
118	1/1.000	1/2	Aucune lésion.	Guérison complète.	Guérison sans lésions.	Neutralisation complète.
	1/2.000	1/2	Très légère réaction locale.	Guérison avec petite induration de la cuisse.	Guérison avec petite induration de la cuisse.	
	1/3.000	1/2	Réaction locale, oedème inguinal léger.	Guérison avec lésion locale indurée.	Guérison avec lésion locale indurée.	
	1/4.000	1/2	Grosse lésion locale, oedème abdominal.	Guérison avec induration de la cuisse.	Guérison incertaine ou avec lésions locales graves et altération de l'état général.	
	1/5.000	1/2	Grosse lésion locale, oedème abdominal, étendu, état grave.	Guérison lente avec induration de la cuisse, altération de l'état général.	Guérison avec induration de la cuisse, altération de l'état général.	
	1/6.000	1/2				
	1/10.000	1/2				
	1/15.000	1/2				
	1/20.000	1/2				
	"	1/2	Mort en 24 heures.	Mort en 24 heures.	Mort en 3 jours.	La dose d'épreuve : 1/2 cent. cube dépasse légèrement la dose minima mortelle.
	"	1/2				
	"	1/4	Etat grave.			
	"	1/10	Grosses lésions.			Guérison avec grosses lésions, mauvais état.

Témoin		1/10		Mort dans la nuit.	La même toxine au $1/4.500$ tue la souris en 48 heures à 3 jours.
		1/40		Mort dans la nuit.	La dose d'épreuve de $1/10$ de centimètre cube dépasse légèrement les cent doses mortelles.
		1/40		Mort dans la nuit.	
		1/1.000		Mort en 36 heures.	
		1/4.000		Mort en 48 heures.	
		1/1.000		Mort en 36 heures.	

ÉPREUVES DE NEUTRALISATION. — La toxine du *B. œdematiens* utilisée pour ces épreuves est filtrée soigneusement sur un nombre suffisant de souris la veille ou l'avant veille de l'essai définitif. Ce contrôle préalable n'empêche pas d'utiliser un assez grand nombre de témoins pour l'expérience elle-même.

L'animal utilisé est la souris blanche, de taille moyenne (12 à 15 grammes environ).

La toxine utilisée est une toxine fraîche provenant d'une culture de *B. œdematiens* en bouillon, culture de quatre à cinq jours, filtrée sur bougie Chamberland L₃ afin d'en éliminer avec certitude tout élément, microbien ou sporulé.

La dose d'épreuve correspond à 100 doses minima mortelles environ; par exemple, pour une toxine tuant la souris au 1/1.000, elle sera de 1/10 de centimètre cube.

La neutralisation s'effectue par mélange pendant une heure, à l'étuve, soit même à la température du laboratoire, de la toxine et de la dilution du sérum étudié.

La moyenne de nos sérums thérapeutiques anti-*œdematiens* neutralisant au 1/1.000, 100 doses mortelles de toxine, nous avons limité d'emblée nos investigations aux dilutions suivantes pour les divers sérums : 1/500, 1/1.000, 1/2.000, 1/3.000. Deux sérums seulement (n°s 120 et 124), donnant des résultats inconstants au 1/1.000, parfois même au 1/500, ont été éprouvés au 1/250.

Le mélange, après une heure de contact, est injecté, par voie sous-cutanée, aux souris.

RÉSULTATS OBTENUS. — Ces résultats diffèrent légèrement d'une expérience à l'autre selon que l'on a utilisé une dose d'épreuve se rapprochant très strictement des 100 doses minima mortelles, ou les dépassant plus ou moins notablement.

D'autre part, certaines toxines tuent les souris témoins rapidement, dans la nuit ou dans les vingt-quatre heures, tandis que d'autres échantillons n'entraînent la mort qu'en quarante-huit heures à trois jours. Dans ce dernier cas, l'inoculation de la toxine ayant lieu sous la peau du ventre, les souris présentent un œdème volumineux de la paroi abdominale, parfois même de la région sternale jusqu'au cou inclusivement. Avec

les échantillons de toxine plus rapidement actifs, il arrive que l'œdème ayant moins de temps pour évoluer, soit plus réduit, parfois nul.

On comprendra que les résultats des expériences varient un peu selon que l'on a utilisé une toxine à action plus ou moins rapide ou brutale. Il y a donc intérêt comme nous le disions plus haut à pratiquer toujours un essai préalable de la toxine sur une assez grande échelle et à multiplier autant que possible les témoins. Le jour même de l'expérience, il est bon de faire une série de témoins avec la dose d'épreuve (100 doses mortelles) et une deuxième série avec la dose minima mortelle présumée ainsi que quelques souris à des doses légèrement supérieures et inférieures. Par exemple : témoins à 1/10 de centimètre cube de toxine (100 doses mortelles); témoins au 1/1.000 (dose mortelle préalablement établie), témoins au 1/500 et au 1/1.500.

En tenant compte des facteurs de variation ci-dessus, les résultats de nos diverses expériences sont très sensiblement superposables quant à la valeur relative des divers sérum anti-œdematiens étudiés.

Ce sont les sérum 112 et 122 qui paraissent jouir le plus régulièrement des propriétés antitoxiques les plus élevées neutralisant 100 doses mortelles de toxine au 1/1.000 et assez régulièrement au 1/2.000. Au 1/3.000 même, ces deux sérum assurent aux souris une légère survie (vingt-quatre heures) par rapport aux témoins.

Les sérum 113 et 121 neutralisent au 1/1.000, quelquefois au 1/2.000 (taux auquel se manifeste au moins une survie appréciable de deux à plusieurs jours); neutralisation nulle, ou survie brève, irrégulière au 1/3.000.

Pour les sérum 118 et 123, la neutralisation au 1/1.000 est de règle avec des doses très proches des 100 doses minima mortelles et avec les toxines lentes. Leur action est moins constante avec des toxines plus brutales et dès que l'on dépasse la dose d'épreuve normale choisie de 100 doses minima mortelles. Leur action est peu notable au 1/2.000, nulle au 1/3.000.

Les séums 120 et 124 n'assurent une protection certaine qu'au 1/250 pour le 120, au 1/250 et 1/500 pour le 124. Irrégulièrement, avec des toxines faibles et une dose d'épreuve

limite (conditions d'expériences très favorables) leur action antitoxique a pu être observée jusqu'au 1/1.000.

L'essai comparatif des divers sérum anti-œdematiens que résume le tableau XVI (expérience du 15 mai 1928) fait ressortir des constatations analogues. La toxine utilisée avait une partie des souris témoins au 1/1.500 en quarante-huit heures à trois jours; la dose d'épreuve ayant été de 1/10 de centimètre cube dépassait sensiblement les 100 doses minima. Les conditions de l'expérience étaient donc sévères et nous les avions voulu telles pour atteindre avec certitude au 1/3000 la limite à laquelle la mort des souris nous permettrait d'apprecier comparativement l'activité antitoxique des huit sérum.

Du point de vue spécial qui nous intéresse, il est utile de rappeler que les sérum 112, 113 et 118 ont été préparés par injections de toxine de *B. œdematiens* centrifugée formolée (sérum à la fois antitoxiques et antimicrobiens) et que les sérum 121, 122, 123 ont été préparés les quatre derniers mois avant l'expérience par injections d'anacultures, c'est-à-dire que leurs propriétés antimicrobiennes devaient être plus accentuées. Les sérum 120 et 124 ont été préparés par des injections de toxine filtrée et formolée. Ils seraient donc antitoxiques purs. Ces sont eux qui jouissent précisément des propriétés antitoxiques les plus réduites. Quant aux autres, le mode différent de préparation des chevaux ne paraît pas avoir eu d'action particulière. Le classement de ces sérum d'après leur activité n'a aucun rapport avec celui effectué selon leurs modes de préparation, qui ne diffèrent d'ailleurs que par la quantité plus ou moins grande de microbes ajoutés à la toxine :

<i>Classement par efficacité décroissante (pouvoir antitoxique)</i>	112, 122, 113, 121, 118, 123, 124, 120			
<i>Classement par mode de préparation</i>	112, 113, 118, 121, 122, 123, 120, 124			
	<table border="0" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">Toxine centrifugée formolée.</td> <td style="text-align: center;">Anaculture.</td> <td style="text-align: center;">Toxine filtrée formolée.</td> </tr> </table>	Toxine centrifugée formolée.	Anaculture.	Toxine filtrée formolée.
Toxine centrifugée formolée.	Anaculture.	Toxine filtrée formolée.		

Sans entrer dans le détail des tableaux comparatifs que nous avons dressés à cet effet, signalons aussi que l'ensemble des titrages mensuels du pouvoir antitoxique de ces sérum effectués au cours de l'année 1927, avant tout essai de préparation particulière des chevaux, donnait des résultats très comparables

PRÉPARATION DES SÉRUMS ANTIGANGRENEUX MONOVALENTS 513

TABLEAU XVIII. — Pouvoir anti-infectieux des sérums anti-oedématisens.

B. — EXEMPLES DE TITRAGE AVEC UNE DOSE D'ÉPREUVE DE CULTURE SUPÉRIEURE A LA DOSE MINIMA MORTELLE (DU 1/2.000 AU 1/50.000).

SERUM	DILUTION	DOSE D'ÉPREUVE en centimètres cubes	Examens au bout de 24 heures		OBSERVATIONS
			Examens au bout de 2 et 3 jours	Examens au bout de 2 et 3 jours	
418	1/2.000	1/2	Réaction locale légère.	Guerison sans lésions.	Neutralisation complète.
	1/3.000	1/2	Lésions plus ou moins accentuées de la cuisse, adème inguinal puis abdominal important.	Guerison avec lésions locales, induction de la cuisse.	Neutralisation incomplète.
	1/4.000	1/2	Grosses lésions locales, petit œdème.	Guerison avec lésions locales et état général précaire.	
	1/5.000	1/2		Excision de l'œdème, puis guérison, état précaire.	
	1/10.000	1/2		Mort en 48 heures.	
	1/20.000	1/2	Grosses lésions, œdème envahissant.	Mort en 3 jours.	Pas de neutralisation.
	1/30.000	1/2			
	1/50.000	1/2			
	1/2.000	1/2	Lésions de la cuisse, pas d'œdème.	Guerison avec petite induration de la cuisse.	Bonne neutralisation.
	1/3.000	1/2	Lésion locale, petit œdème.	Guerison avec petites lésions.	
413	1/4.000	1/2	Lésion locale, œdème abdominal important.	Induration de la cuisse, œdèmes, guérison.	Neutralisation incomplète.
	1/3.000	1/2	Lésion locale importante, gros œdème.	Mort en 3 jours.	
	1/10.000	1/2	Lésion locale importante, peu d'œdème.	Mort en 36 heures.	
	1/20.000	1/2	Grosses lésions locales, œdème abdominal peu étendu.	Mort en 3 jours.	
	1/30.000	1/2		Mort en 48 heures.	
»	1/50.000	1/2		Mort en 3 jours.	
	"	1/2	Mort dans la nuit.		
	"	1/2	Etat grave, œdème envahissant.	Mort le 3 ^e jour.	
	"	1/2			
»	"	1/4	Grosses lésions locales, peu d'œdème.	Mort le 3 ^e jour.	
	"	1/40	Grosses lésions locales, peu d'œdème.	Mort le 3 ^e jour.	
»	"	1/10	1/10 de centimètre cube étant mortel, la dose d'épreuve de 1/2 cent. cube rend les conditions de l'expérience très sévères.		
	"	1/10			

quant à l'efficacité intrinseque de chacun de ces sérums et quant à leur valeur relative.

Une constatation se dégage aussi de l'examen de ces titrages successifs, pour les sérums 120 et 124 préparés exclusivement par injection de toxines filtrées formolées. Si dans l'ensemble ces sérums sont inférieurs aux sérums à la fois antitoxiques et antimicrobiens, on remarque aussi l'irrégularité des titrages successifs. Le sérum 120, très inférieur aux titrages de Mars et Avril 1927, semblait avoir atteint le 1/1.000 en Mai et Juin, puis on le retrouve très inférieur à la fin de la même année ainsi qu'en 1928 (1/250). Le sérum 124 très inférieur au début de 1927 (1/100 en Avril, 1/50 en Mai, 1/100 en Juin) semble passer par un optimum en fin 1927 et début 1928. A nos derniers titrages, il ne neutralisait plus qu'au 1/500. Ces irrégularités, évidemment normales dans une certaine limite pour tous les sérums d'un titrage à l'autre, sont anormalement accusées pour les sérums antitoxiques *œdematiens* 120 et 124.

POUVOIR ANTI-INFECTIEUX.

SOUCHES UTILISÉES. — Dans les recherches concernant le pouvoir anti-infectieux des sérums anti-*œdematiens*, nous avons utilisé la souche courante du laboratoire, moins toxigène que la souche *Del.*, et employée pour apprécier le pouvoir antitoxique, mais avec laquelle nous avions obtenu des échantillons plus régulièrement pathogènes pour le cobaye au cours de passages successifs effectués chez cet animal, en 1927.

Par contre, nous n'avons pas recherché les plus virulents parmi ces échantillons, mais ceux donnant à des doses moyennes ($1/2$, $1/4$, $1/10$ de centimètre) cube les lésions les plus constantes chez le cobaye par injection intramusculaire dans la cuisse.

Avant de commencer nos expériences, nous avons essayé comparativement la souche *Del.*; en dépit de son pouvoir toxigène très net, elle ne nous a pas donné de résultats supérieurs au point de vue pathogène chez le cobaye.

ÉPREUVES DE NEUTRALISATION. — Elles ont été pratiquées selon la technique générale que nous avons indiquée.

L'animal utilisé est le cobaye.

Une culture de vingt-quatre heures en bouillon est pathogène aux doses de $1/4$ à $1/10$ de centimètre cube, entraînant la mort de l'animal parfois dans la nuit, généralement en vingt-quatre heures ou trente-six heures. La dose de $1/20$ de centimètre cube s'est montrée mortelle dans quelques-uns de nos essais. Nous avons plutôt cherché des cultures donnant des lésions comparables et plus constante au $1/2$ ou au $1/4$ de centimètre cube.

La toxine du *B. œdematiens* se développant dans les milieux liquides jusqu'au quatrième ou cinquième jour après l'ensemencement, nous nous étions demandé si, l'action toxique aidant, l'action pathogène des cultures ne serait pas, soit plus forte, soit plus constante, en utilisant des cultures de trois, quatre ou cinq jours. Une série d'essais effectués dans ce sens nous ont montré, au contraire, que, si la toxine est plus active dans ces cultures, leur action pathogène est beaucoup plus irrégulière chez le cobaye. Ce résultat s'explique *a priori* par la sporulation rapide du *B. œdematiens* dans des cultures en milieu liquide. Le facteur corps microbien et la vitalité des éléments microbiens jouent dans la marche de l'infection un rôle prépondérant, et, pour obtenir des résultats plus constants, il y a intérêt à utiliser des cultures jeunes (dix-huit à vingt heures) riches en éléments microbiens jeunes, la toxine développée étant suffisante pour appuyer leur action pathogène dans l'organisme. Nos titrages ont donc été faits avec des cultures en bouillon de dix-huit à vingt heures, avec des doses mortelles variant de $1/2$ à $1/4$ de centimètre cube (plus rarement $1/10$).

La neutralisation s'effectue par contact entre la culture (dose d'épreuve) et les différentes dilutions du sérum à étudier, contact d'une heure à l'étuve ou à la température du laboratoire. On éprouve le mélange par injection intramusculaire dans la cuisse.

ACTION ANTI-INFECTIEUSE DES SÉRUMS ANTI-ŒDEMATIENS. — L'action anti-infectieuse des sérum anti-*œdematiens* est très nette, même avec des dilutions très étendues de ces sérum ($1/20.000$, $1/30.000$). Beaucoup plus encore qu'avec les autres

anaérobies des gangrènes gazeuses, on note avec le *B. oedematiens* une différence considérable d'action, selon que la dose d'épreuve utilisée dans les expériences se maintient aussi exactement que possible au voisinage de la dose minima mortelle de culture, ou qu'elle s'écarte au contraire assez sensiblement. Cette particularité nous a entraîné à des expériences préliminaires nombreuses; pour fixer les idées, aussi bien que pour la documentation de ceux qui désireraient renouveler ou compléter ces recherches, nous donnons à titre d'exemple deux tableaux : l'un d'expériences effectuées avec une dose d'épreuve voisine de la dose minima mortelle (titrage du 9 juin 1928) et l'autre de titrages où cette dose est au contraire assez nettement supérieure (titrage du 15 juin 1928) [Voir tableaux XVII et XVIII].

L'examen comparatif de ces tableaux montre que la neutralisation de 1/2 cent. cube de culture par des doses de sérum encore très faibles (1/20.000 de centimètre cube) évite la mort des cobayes inoculés. Du 1/1.000 au 1/3.000, la neutralisation est complète, ou presque : les cobayes guérissent sans lésion ou avec de petites indurations de la cuisse au point d'injection. Au 1/4.000 et au 1/5.000, la neutralisation n'est plus que partielle : aux premières heures, l'extension de l'oedème à la région inguinale, aux parties génitales, parfois même à une partie de la région abdominale prouve que la culture a conservé partiellement sa virulence. La guérison est plus lente ; la cuisse inoculée reste plus ou moins indurée, sans que l'état général du malade soit réellement atteint. Du 1/6.000 au 1/20.000 les lésions sont très accusées ; au moins l'animal a-t-il la vie sauve, mais les oedèmes sont très étendus ; les lésions locales, au point d'injection, laissent de grosses indurations et surtout l'état général du cobaye, très mauvais au cours de l'évolution qui dure de quatre à cinq jours à plus d'une semaine, laisse le sujet localement guéri mais très amaigri, et dans un état de santé précaire.

Avec une dose d'épreuve plus forte : 1/2 cent. cube (mais correspondant à 3 doses minima mortelles) la neutralisation reste satisfaisante jusqu'au 1/2.000 et même 1/3.000 pour certains sérums. Par contre, dès que l'on dépasse ces dilutions, si le cobaye ne meurt pas, il manifeste de graves lésions et son

état général, même après guérison, reste médiocre. Quelques sérum dans ces épreuves sévères assurent la survie définitive des animaux inoculés jusqu'au 1/15.000 et 1/20.000 ; dans le cas le plus général, la mort des sujets s'observe dès que la dilution de sérum dépasse le 1/5.000.

Nous avons remarqué, ainsi que le fait ressortir l'expérience pratiquée avec le sérum 113 (15 juin 1928), que l'évolution des lésions entraînant la mort diffère souvent selon la dose neutralisante du sérum employé. C'est ainsi qu'au 1/4.000 et au 1/5.000, les lésions locales, dans la cuisse injectée, restent relativement discrètes ; par contre, un œdème important, en plaque épaisse, envahit progressivement la région inguinale, les parties génitales, l'abdomen, remontant jusqu'au sternum et au cou, tandis que l'animal fond à vue d'œil. Tout se passe comme si l'inoculation infectante était graduellement neutralisée avec tendance à la guérison des lésions locales, la mort survenant par résorption des produits toxiques élaborés au niveau de l'œdème sterno-abdominal. Aux taux plus élevés (1/20.000, 1/30.000, 1/50.000) les lésions de la cuisse sont au contraire d'emblée très graves et semblent réaliser à elles seules l'intoxication du sujet, tandis que l'œdème des parties voisines est beaucoup moins considérable que dans le cas précédent. Nous signalons ces constatations sans en faire pourtant une règle générale, car nous avons observé aussi des exceptions.

RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES DIVERS SÉRUMS ANTI-ŒDEMATIENS. —

Tous les sérum réalisent une protection, complète ou incomplète, à des taux élevés, lorsque la dose d'épreuve est très voisine de la dose minima mortelle de culture. Sauf avec le sérum 120, qui s'est montré constamment inférieur aux autres, les résultats sont très analogues à ceux de l'expérience du sérum 118 (9 juin 1928) [Voir tableau XIX].

La neutralisation complète, chez le cobaye, de doses mortelles de culture (pouvoir anti-infectieux) ne dépassant pas sensiblement le double de la dose minima mortelle s'obtient assez régulièrement jusqu'à la dilution 1/2.000 des sérum.

Il faut noter que ces résultats sont superposables à ceux obtenus dans la neutralisation de 100 doses minima mortelles

TABLEAU XIX. — Essai comparatif des divers sérums anti-oedematiens pouvoir anti-infectieux.

DOSE D'ÉPREUVE DE CULTURE : PLUSIEURS DOSES MORTELLES ($1/1.000$, $1/10.000$, $1/30.000$).

N° SERUMS	PRÉPARATION	DILUTION	COBATES INGÜCULÉS DANS LA CUISSE (injection intramusculaire)	OBSERVATIONS	
				Examen au bout de 18 à 20 heures	Examen ultérieur : 24 heures à 4 à 5 jours
412	Toxine centrifugée formolée.	$1/1.000$ $1/10.000$ $1/30.000$	$1/2$ $1/2$ $1/2$	Légère lésion locale. Lésion importante, pas d'œdème. Lésion importante, œdème.	Guerisson complète. Mort en 40 heures. Mort en 24 heures.
413	Toxine centrifugée formolée.	$1/1.000$ $1/10.000$ $1/30.000$	$1/2$ $1/2$ $1/2$	Petite lésion locale. Cuisse énorme, petit œdème inguinal. Cuisse énorme, œdème abdominal.	Guerisson complète. Mort en 24 heures. Mort en 36 heures.
418	Toxine centrifugée formolée.	$1/1.000$ $1/10.000$ $1/30.000$	$1/2$ $1/2$ $1/2$	Lésion moyenne de la cuisse, peu d'œdème. Grosses lésions, œdème. Grosses lésions, œdème.	Neutralisation temporaire, mort en 40 heures. Mort en 24 heures. Mort en 24 heures.
421	Anaculture.	$1/1.000$ $1/10.000$ $1/30.000$	$1/2$ $1/2$ $1/2$	Petites lésions. Grosses lésions, œdème. Grosses lésions, œdème.	Neutralisation temporaire, mort en 40 heures. Mort en 24 heures. Mort en 24 heures.
422	Anaculture.	$1/1.000$ $1/10.000$ $1/30.000$	$1/2$ $1/2$ $1/2$	Lésions insignifiantes. Etat grave.	Guerisson complète. Mort dans la cuisse.

423	Anaculture.	$1/10,000$	$1/2$	Grosses lésions locales, peu d'œdème. Grosses lésions, Grosses lésions.	Mort dans la nuit. Mort en 36 heures.	Neutralisation incomplète, guérison.
		$1/10,000$	$1/2$	Grosses lésions, œdème abdominal envahissant. Grosses lésions, œdème abdominal envahissant. Grosses lésions, œdème abdominal envahissant.	Mort dans la nuit. Mort dans la nuit. Mort dans la nuit.	
		$1/30,000$	$1/2$			
420	Toxine filtrée formolée.	$1/4,000$	$1/2$			Neutralisation incomplète.
		$1/10,000$	$1/2$			
		$1/30,000$	$1/2$			
424	Toxine filtrée formolée.	$1/1,000$	$1/2$	Grosse lésion locale, peu d'œdème. Lésions graves, œdème abdominal. Lésions graves, œdème abdominal.	Guérison avec induration de la cuisse. Mort dans la nuit. Mort dans la nuit.	$1/10$ de cent. cube provoque des lésions mortelles. L'épreuve avec $1/2$ cent. cube est donc sévère.
		$1/10,000$	$1/2$			
		$1/30,000$	$1/2$			
425	Toxine filtrée formolée.	"	$1/2$			$1/10$ de cent. cube provoque des lésions mortelles. L'épreuve avec $1/2$ cent. cube est donc sévère.
		"	$1/2$	Mort dans la nuit. Grosses lésions, œdème éthiophile, mourant.	Mort en 20 à 24 heures. Mort en 20 à 24 heures.	
		"	$1/2$	Grosses lésions, œdème éthiophile, mourant.		
		"	$1/4$	Mort dans la nuit.		
426	Toxine filtrée formolée.	"	$1/10$	Etat grave, grosses lésions.	Mort en 20 à 24 heures.	$1/10$ de cent. cube provoque des lésions mortelles. L'épreuve avec $1/2$ cent. cube est donc sévère.
		"	$1/20$			

de toxine (pouvoir antitoxique) chez la souris par les mêmes sérums au 1/2.000.

Puisque nous cherchions surtout à déterminer la valeur comparée des sérums préparés par des procédés différents, il était surtout intéressant d'atteindre certainement la limite d'efficacité de tous ces sérums, c'est-à-dire de réaliser une épreuve particulièrement sévère. La dose de 1/2 cent. cube de culture employée le 22 juin (tableau XIX) dépasse de beaucoup la dose minima mortelle puisque cette culture tuait les témoins en vingt à vingt-quatre heures au 1/10. En dépit des conditions très défavorables de cet essai, tous les sérums se sont montrés actifs au 1/1.000, à l'exception du n° 120.

La guérison fut complète avec les sérums 112, 113, 122; les cobayes guériront avec des lésions locales accusées avec les sérums 123 et 124. La neutralisation obtenue avec les sérums 118 et 121 paraissait satisfaisante au cours des premières vingt-quatre heures, puis l'infection reprit son cours. Le serum 120 reste nettement inférieur.

Au point de vue de leur pouvoir anti-infectieux, les sérums les plus actifs se trouvent donc aussi bien dans le groupe de ceux préparés par des injections de toxine centrifugée formolée que par des injections d'anaculture. Viennent en deuxième ligne, ou au dernier rang, les deux sérums préparés par injections de toxine filtrée.

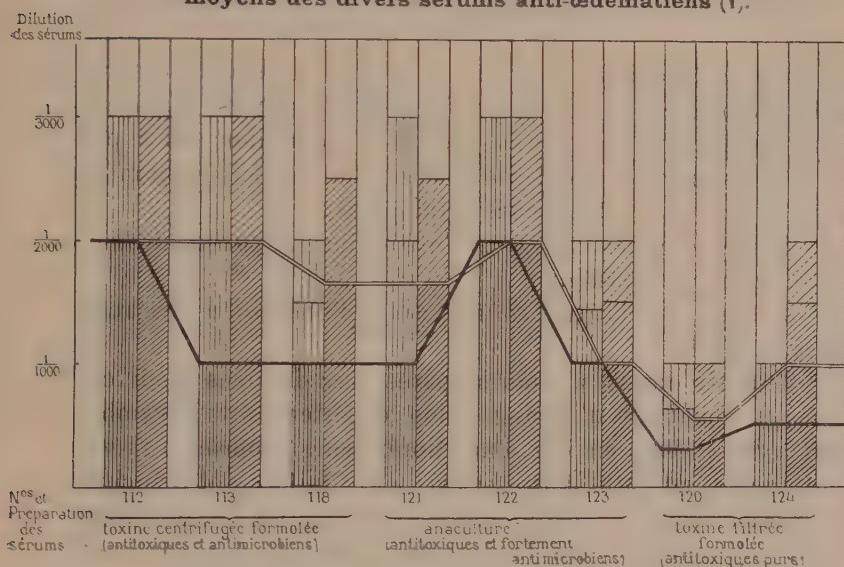
POUVOIR AGGLUTINANT.

L'auto-agglutination des cultures du *B. œdematiens* en milieux liquides est une des caractéristiques de cet anaérobie. Il est donc impossible d'étudier l'agglutination de ce germe en recourant aux procédés ordinaires.

Nous avons tenté d'obtenir des cultures homogènes de *B. œdematiens* en le cultivant en bouillon phosphaté d'après la technique indiquée par DOCHEZ, AVERY et LANCEFIELD à propos de la biologie du streptocoque (*Journ. exp. med.*, 1^{er} septembre 1919). Nous avons effectué des passages successifs du microbe en bouillon phosphaté pendant un mois environ : passages journaliers, ou avec réensemencements plus espacés. Ces essais n'ont donné que des résultats médiocres ou très inconstants.

Si quelques cultures ont conservé assez longtemps leur apparence homogène en bouillon, elles finissaient toujours par se rassembler au fond du tube en un dépôt plus ou moins grumeleux traduisant la même tendance à l'auto-agglutination. Les corps microbiens de ces cultures, à homogénéité temporaire, recueillis par centrifugation, à différents âges de la culture, puis

TABLEAU XX. — Pouvoir antitoxique et pouvoir anti-infectieux moyens des divers sérums anti-œdématisiens (1).



Pouvoir antitoxique (hachures verticales, trait plein).

Pouvoir anti-infectieux (hachures diagonales, trait double).

Neutralisation complète, guérison sans lésions appréciables (hachures serrées); incomplète, guérison avec lésions locales. Quelques insuccès (hachures moyennes); douteuse, guérison aléatoire. Survies de durée variable (hachures larges).

émulsionnés en eau physiologique ont toujours subi l'auto-agglutination.

Nous avons fait d'autres essais en émulsionnant les corps microbiens non pas dans de l'eau physiologique au taux ordinaire de 8 à 9 p. 100, mais à un taux très faible de chlorure de sodium (1 p. 1.000). Les résultats obtenus n'ont pas été plus satisfaisants.

Ces quelques recherches négatives n'excluent pas néanmoins

(1) Doses d'épreuve : Toxine, cent fois la dose minima mortelle; culture, deux doses mortelles environ.

toute idée de pouvoir, soit en modifiant légèrement ces procédés, soit par d'autres techniques, obtenir des émulsions homogènes assez stables pour permettre des épreuves d'agglutination avec le *B. aedematiens* que nous n'avoûns pu, pour le moment, encore réaliser.

CHAPITRE III

INDICATIONS D'ORDRE GÉNÉRAL ET RÉSUMÉ

L'étude méthodique et suivie de tous les chevaux préparés au laboratoire en vue de la production des sérum thérapeutiques antigelanteux nous a permis d'accumuler peu à peu sur la question une abondante documentation. Cette documentation se groupe en 3 périodes principales :

1^o Titrages des sérum avant l'utilisation des toxines formolées pour leur préparation ;

2^o Titrages des mêmes sérum après l'utilisation des antigènes formolés ;

3^o Titrages des 38 sérum préparés avec diverses modifications des techniques d'immunisation (expériences de Novembre 1927 à Mars 1928) en vue d'améliorer leurs propriétés thérapeutiques. C'est cette dernière partie qui fait l'objet principal du présent travail. Néanmoins, un coup d'œil d'ensemble rétrospectif sur tous ces documents permet de dégager quelques constatations d'ordre général que nous essayerons de préciser dans les paragraphes suivants.

I. — Pouvoir antitoxique et anti-infectieux des sérum antitoxiques, antimicrobiens, ou à la fois antitoxiques et antimicrobiens (1). Pouvoir agglutinant.

A. — POUVOIR ANTITOXIQUE.

B. perfringens. — Au point de vue antitoxique, les sérum anti-*perfringens* manifestent leur activité par une double action : antihémolytique et antineurotoxique.

(1) Rappelons qu'en dépit des restrictions que nous apporterons plus loin à ces dénominations, nous appellerons, pour simplifier cet exposé : sérum

Le taux de neutralisation de l'hémolysine *perfringens* est sensiblement inférieur à celui de neutralisation de la neurotoxine.

Le mode de préparation des sérum n'influe pas très sensiblement sur leur activité antineurotoxique ; par contre, on note une différence très nette en ce qui concerne leur pouvoir anti-hémolytique. A ce point de vue, le sérum antimicrobien pur n° 239 est moins actif que le sérum antitoxique n° 233, lui-même inférieur aux sérum mixtes (n° 219).

La meilleure activité antitoxique revient donc aux sérum anti-*perfringens* préparés par injections d'antigènes mixtes (toxine centrifugée, anacultures) ; les sérum antitoxiques viennent en deuxième ligne. Quant aux sérum antimicrobiens, ils paraissent nettement inférieurs aux précédents.

Vibrio septique. — Le sérum antitoxique n° 336 jouit de propriétés neutralisantes vis-à-vis de la toxine du Vibrio septique sensiblement équivalentes à celles des sérum antimicrobiens et antitoxiques tout à la fois. Seul, le sérum antimicrobien n° 337 jouit de propriétés antitoxiques nettement inférieures aux autres sérum.

B. histolytique. — Pour les sérum anti-histolytiques, le sérum antitoxique n° 312 montre une infériorité très nette au point de vue de ses propriétés purement antitoxiques vis-à-vis des trois autres sérum à la fois antitoxiques et antimicrobiens.

B. œdematiens. — Les deux sérum n° 120 et 124 (antitoxiques) sont nettement inférieurs au point de vue de leur pouvoir antitoxique à tous les autres sérum de la série (antitoxiques et antimicrobiens, à la fois).

CONCLUSION. — Le pouvoir neutralisant des sérum préparés par injection aux chevaux de toxines filtrées, à l'exclusion de corps microbiens, vis-à-vis de la toxine correspondante (pou-

antitoxiques ceux préparés par des injections au cheval de toxines filtrées, c'est-à-dire débarrassées de toutes traces de corps microbiens ;

Sérum antimicrobien, ceux préparés avec des corps microbiens seuls, à l'exclusion de toute toxine ajoutée ;

Nous considérons comme à la fois antitoxiques et antimicrobiens les sérum dans la préparation desquels entrent, en proportions diverses, des corps microbiens et des toxines (sérum mixtes).

Nous verrons d'ailleurs combien cette dénomination reste conventionnelle.

voir antitoxique) se montre le plus généralement inférieur (sérum anti-*perfringens*, sérum anti-histolytique, anti-*œdematiens*) au pouvoir antitoxique des sérum mixtes préparés avec des antigènes renfermant, en proportions relatives variables, à la fois toxine et microbes; tout au plus y a-t-il équivalence (sérum anti-*Vibrio septique*), mais nous n'avons jamais rencontré de sérum antitoxique jouissant de propriétés purement antitoxiques supérieures à celles des sérum mixtes de la même série.

B. — POUVOIR ANTI-INFECTIEUX.

B. perfringens. — Le pouvoir anti-infectieux du sérum antitoxique (n° 233) est sensiblement équivalent à la moyenne des pouvoirs anti-infectieux des sérum mixtes.

Le sérum antimicrobien (n° 239) manifeste un pouvoir anti-infectieux nettement inférieur.

Vibrio septique. — Même constatation : le sérum exclusivement antimicrobien n° 337 reste inférieur, comme pouvoir anti-infectieux, aux sérum mixtes et même au sérum antitoxique pur.

[Pour le *B. histolytique* et le *B. œdematiens*, les disponibilités en chevaux neufs ne nous ont pas permis de procéder à une immunisation exclusivement antimicrobienne.]

CONCLUSION. — Le pouvoir anti-infectieux le meilleur revient aux sérum à la fois antitoxiques et antimicrobiens. Les sérum purement antitoxiques jouissent d'un pouvoir anti-infectieux sensiblement équivalent. Seuls les sérum antimicrobiens purs de la même série (préparation par injections de microbes formolés) jouissent de propriétés anti-infectieuses inférieures aux autres sérum.

C. — POUVOIR AGGLUTINANT.

POUVOIR AGGLUTINANT ET POUVOIR ANTI-INFECTIEUX.

POUVOIR AGGLUTINANT DES SÉRUMS ANTITOXIQUES.

B. perfringens. — Les courbes représentant le pouvoir anti-infectieux et le pouvoir agglutinant des sérum mixtes sont sinon parallèles, du moins très comparables (tableau VI). Il

existe pourtant des exceptions : par exemple, le sérum mixte n° 219 doué d'un pouvoir agglutinant particulièrement fort ($1/30.000$) est médiocrement anti-infectieux ; inversement, le sérum n° 236, très faiblement agglutinant, est doué d'un pouvoir anti-infectieux très satisfaisant.

Le sérum antitoxique (n° 233), nettement anti-infectieux, jouit d'un bon pouvoir agglutinant ($1/2.000$).

Le sérum antimicrobien (n° 239), agglutinant au $1/1.000$, n'a qu'un pouvoir anti-infectieux médiocre.

Vibron septique. — La courbe représentant le pouvoir agglutinant des sérums n'a aucun rapport avec celle exprimant leur pouvoir anti-infectieux. Il est à noter pourtant que tous les sérums anti-Vibron septique jouissant, dans l'ensemble, d'un bon pouvoir anti-infectieux sont tous très agglutinants ; par contre, on constate que certains sérums très agglutinants (au delà de $1/100.000$), comme le sérum n° 339, ne sont nullement plus anti-infectieux que d'autres (n°s 327, 332) qui n'agglutinent qu'au $1/7.000$.

Le sérum antimicrobien n° 337 est très agglutinant ($1/100.000$) ; son pouvoir anti-infectieux est tout à fait inférieur.

Le sérum purement antitoxique (n° 336) agglutine au $1/7.000$ la souche homologue.

B. histolytique. — Constatations analogues : le sérum n° 315, n'agglutinant qu'au $1/2.000$, a les mêmes propriétés anti-infectieuses que d'autres sérums (n°s 311-313) agglutinant au $1/7.000$. Le sérum purement antitoxique, n° 312, est agglutinant au $1/500$.

B. œdematiens. — Pas d'agglutinations de lecture pratique facile.

CONCLUSION. — Les sérums à la fois antitoxiques et antimicrobiens, doués de pouvoir anti-infectieux généralement satisfaisant, sont tous nettement agglutinants. Dans l'ensemble, ces deux propriétés vont de pair ; mais cette règle offre beaucoup d'exceptions, et il est impossible de préjuger du pouvoir anti-infectieux d'un sérum uniquement d'après son pouvoir agglutinant, si élevé que soit ce dernier.

Les sérums exclusivement antimicrobiens sont doués presque

tous d'un pouvoir agglutinant élevé; par contre, leur pouvoir anti-infectieux est toujours médiocre.

Les sérum antitoxiques purs sont doués d'un pouvoir agglutinant très net, parfois même très élevé (1).

D. — SÉRUMS ANTITOXIQUES ET SÉRUMS ANTIMICROBIENS. RELATIVITÉ DE CES DÉNOMINATIONS.

L'ensemble des constatations précédentes montre combien est loin d'être absolue la distinction que l'on peut faire entre les sérum antitoxiques et les sérum antimicrobiens. Nous avons vu, qu'en fait, les sérum préparés exclusivement avec des toxines filtrées jouissent de propriétés agglutinantes parfois élevées. Inversement, nous avons cité l'exemple de sérum préparés exclusivement avec des corps microbiens et possédant indiscutablement des propriétés antitoxiques. Ce fait résulte de ce que les corps microbiens renferment toujours une petite quantité de toxine et que les toxines filtrées, elles, contiennent une quantité plus ou moins grande de produits de désintégration microbienne dont l'absorption par l'organisme provoque la production d'agglutinines (2).

La dénomination de sérum antitoxiques purs, antimicrobiens ou mixtes (à la fois antitoxiques et antimicrobiens) correspond donc beaucoup plus au mode de préparation de ces sérum qu'à leurs propriétés effectives. Celles-ci (antitoxiques ou antimicrobiennes) se trouvent alliées dans tous les sérum avec une prépondérance variable de l'un à l'autre selon le mode de préparation et, en partie aussi, selon les aptitudes diverses à réagir de l'animal immunisé. C'est avec cette réserve qu'on peut employer ces dénominations, d'ailleurs commodes pour éviter dans la rédaction, comme nous l'indiquions au début de ce chapitre, de longues périphrases destinées à préciser le mode d'immunisation utilisé pour préparer ces sérum.

(1) L'ensemble de ces conclusions est à rapprocher du fait que nous signalions au début de ce travail : lorsque l'on met en contact, *in vitro*, une dose connue de culture et un sérum à des dilutions diverses pour éprouver son pouvoir anti-infectieux, on ne peut préjuger de sa valeur d'après la simple modification d'aspect du milieu (homogénéité persistante, trouble nuageux, agglutination plus ou moins massive) que l'on observe pendant la durée de ce contact.

(2) M. WEINBERG et J. BAROTTE. *C. R. Soc. de Biologie*, 97, 1927, p. 1528.

E. — SÉRUMS PRÉPARÉS PAR INJECTIONS DE MICROBES FORMOLÉS.
VARIABILITÉ DU TAUX DES ANTICORPS.

Les propriétés, soit antitoxiques, soit antimicrobiennes des sérums préparés exclusivement par des injections de corps microbiens formolés se sont toujours montrées assez instables, c'est-à-dire très irrégulières, d'un titrage à l'autre. Il semble que la production des anticorps chez les chevaux immunisés seulement par des corps microbiens formolés ne se manifeste avec quelque intensité que lorsqu'ils ont reçu une quantité globale déjà élevée de microbes, et lorsque chacune des injections immunisantes comporte déjà une assez forte quantité de ces microbes. Cela revient à dire que la quantité des anticorps décelables au début de la préparation des sujets reste minime, ou n'augmente que très lentement, au début de l'immunisation. Pourtant, lorsque cette immunisation est poussée déjà à un point assez avancé, et en « chargeant » l'animal avec des doses aussi élevées que le permettent ses réactions et les plus rapprochées possible (injections hebdomadaires), on peut obtenir pendant plusieurs saignées successives de bons titrages. Par contre, toute interruption de titrage (accidentelle ou résultant d'un repos périodique accordé au producteur de sérum), ou simplement l'espacement des injections, provoquent une chute considérable des anticorps se manifestant par des titrages médiocres. Une nouvelle période de préparation intensive est, dans ce cas, indispensable pour ramener le cheval à son degré primitif d'immunisation; encore, ce résultat n'est-il obtenu que de façon inconstante et les résultats des nouveaux titrages restent souvent légèrement inférieurs à ceux obtenus d'emblée avec l'animal neuf.

Cette constatation est à rapprocher d'un fait que nous avons signalé antérieurement; nous n'avons pu obtenir, avec le cheval n° 329 dont nous avions modifié l'immunisation en cours depuis de longs mois avec de la toxine formolée, d'amélioration très appréciable du pouvoir antitoxique de son sérum, malgré une série assez sévère d'injections à hautes doses de toxine filtrée facile et non alténuée. Dans ce cas, comme dans le fait que nous signalions à propos de sérums préparés par des

microbes formolés, il semble que l'aptitude à réagir paraisse atténuée par une longue immunisation antérieure, par rapport aux résultats que l'on obtient d'emblée avec le même procédé, chez un animal neuf.

II. — Comparaison entre la moyenne des titrages effectués avant l'utilisation des antigènes formolés et les titrages actuels.

L'utilisation d'antigènes formolés dans l'immunisation des chevaux destinés à la production des sérum s antigangreneux nous a apporté le bénéfice de toutes les facilités qui accompagnent l'emploi des toxines formolées :

Immunisation plus intensive permise par les réactions minimes des chevaux injectés; rapprochement des injections; progression plus rapide vers les doses élevées d'antigène;

Meilleur état général des chevaux, d'où réduction des accidents d'immunisation, des pertes, et augmentation du rendement en sérum.

A l'emploi toujours délicat des toxines de nos anaérobies qui nécessitaient surtout, au début de l'immunisation, une filtration parfaite sous peine d'accidents gangréneux toujours très graves, souvent mortels pour les animaux, a succédé l'utilisation de toxines simplement centrifugées avant traitement par le formol. Tous les éléments microbiens, ou sporulés, étant détruits à des taux de formol variant de 3 à 4 ou 5 p. 1000 suivant les germes et l'abondance des cultures, il était possible d'injecter ces toxines même par voie sous-cutanée avec d'assez fortes proportions de corps microbiens restants. Nous avons même été amenés à utiliser, sous réserve de certaines précautions, des anacultures, puis à tenter l'immunisation par des corps microbiens formolés seuls, à des doses parfois considérables.

On saisit donc les grands avantages que nous avons pu retirer de l'utilisation des antigènes formolés.

**DIMINUTION DU POUVOIR ANTITOXIQUE
AU PROFIT DU POUVOIR ANTI-INFECTIEUX.**

Par contre, la comparaison des titrages effectués sur l'ensemble des sérum avant et après l'introduction de ces antigènes formolés dans la pratique fait ressortir une assez forte diminution du pouvoir antitoxique moyen du sérum anti-Vibron septique et du sérum anti-histolytique; en compensation, il est juste d'ajouter que leur pouvoir anti-infectieux paraît plutôt augmenté.

Donc : diminution assez sensible du pouvoir antitoxique compensée par une augmentation inverse appréciable du pouvoir anti-infectieux pour deux de nos séums, tel est, pour la moyenne des séums antigangreneux monovalents, le bilan de l'introduction dans notre pratique courante des antigènes formolés. Ce résultat ne nous avait pas échappé, dès 1926; mais nous ne nous en étions pas particulièrement inquiétés, les taux antitoxiques primitivement obtenus par l'emploi des toxines non atténuerées étant réellement au-dessus de la moyenne. D'autre part, il nous semblait utile d'augmenter le pouvoir anti-infectieux des séums, fût-ce même aux dépens de leurs propriétés antitoxiques, les complications gangreneuses des traumatismes relevant d'abord de la pullulation microbienne des anaérobies avant que leur action toxique n'entre en jeu dans l'organisme.

Néanmoins, de telles différences se sont révélées entre nos anciens titrages antitoxiques et les titrages actuels, en particulier pour les toxines histolytique et Vibron septique (quoique à un degré moindre) que nous avons jugé utile de préparer quelques chevaux d'après les anciennes méthodes (toxine filtrée pure, puis toxine centrifugée), afin de renforcer par leur mélange le taux anti-toxique moyen des séums anti-histolytique et anti-Vibron septique.

On ne manquera pas de s'étonner de la constatation précédente. L'action du formol sur les toxines diphtérique et téta-nique s'exerce exclusivement aux dépens de leurs fonctions toxiques et laisse intactes leurs propriétés antigènes. Les titres antitoxiques extrêmement élevés des séums antidiphté-

riques et antitétaniques obtenus par l'emploi des anatoxines et titrés par le procédé de la flocculation initiale de Ramon ne laissent aucun doute à ce sujet. De nombreux auteurs ont utilisé depuis le formol pour atténuer les antigènes, toxiques ou infectieux, les plus divers et en ont obtenu les mêmes excellents résultats, avec une conservation presque intégrale du pouvoir antigène. Il est donc curieux que certaines toxines des anaérobies, en premier lieu la toxine du *B. histolytique*, puis à un degré moindre celle du *Vibron septique*, paraissent à ce point altérables par le formol dans leurs fonctions antigènes.

INTERPRÉTATION DE CE FAIT.

Deux explications de ce fait se présentent *a priori* : l'une résultant de la complexité même des toxines incriminées, l'autre de la présence de formes sporulées dans les cultures, ce qui entraîne l'utilisation de doses élevées de formol.

1^o COMPLEXITÉ DES TOXINES DU *B. HISTOLYTIQUE* ET DU *VIBRION SEPTIQUE*. — Un de ces germes (*B. histolytique*) est doué d'une action protéolytique très accentuée, vis-à-vis de tous ses milieux de culture. La toxine obtenue, soit par centrifugation, soit par filtration, est donc constituée par un complexe : d'une part, la toxine (sécrétion microbienne) proprement dite, d'autre part les produits de désintégration des matières protéiques du milieu de culture qui jouent un rôle indubitable dans les accidents provoqués par la toxine totale chez les animaux de laboratoire.

Il ne paraît donc pas impossible que, si le formol laisse aux sécrétions microbiennes toute leur valeur antigène, il agisse, par contre, en modifiant profondément les produits de désintégration du milieu de culture lui-même, en formant un nouveau complexe très différent du premier. Il ne s'agit évidemment que d'une interprétation ; pourtant, si hypothétique qu'elle paraisse, deux constatations semblent l'étayer.

a) Le fait que la toxine du *B. histolytique*, de beaucoup le plus protéolytique des deux germes, est beaucoup plus attaquée par le formol que celle du *Vibron septique*; c'est, par suite, le sérum anti-histolytique dont les propriétés anti-

toxiques ont le plus souffert de l'emploi des antigènes formolés;

b) L'absence presque complète de graduation dans les effets de la toxine de ces deux anaérobies au-dessous de la dose minima mortelle. L'action de cette dose minima mortelle, introduite dans la veine, est brutale et en beaucoup de points comparable à des accidents de choc. Une dose à peine inférieure à cette dose minima mortelle semble laisser l'animal indifférent, au moins dans les instants qui suivent l'injection, mais il est fréquent que des symptômes toxiques à échéance plus lointaine se manifestent dans les jours suivants (amaigrissement, parésies, dyspnées) compromettant gravement l'état du sujet, sinon mortelles. Bien que nous n'ayons pu vérifier encore cette dualité probable des éléments constitutifs de la toxine il semble logique d'admettre l'action importante dans les accidents toxiques des produits de désintégration protéique qui, eux, seraient précipitables ou altérables par le formol.

2^e PRÉSENCE DE FORMES SPORULÉES DANS LES CULTURES. — Les formes sporulées apparaissent très rapidement dans toutes les cultures des anaérobies de la gangrène gazeuse et leur résistance particulière à tous les agents de destruction oblige à employer le formol à des taux parfois élevés. Ce taux varie, selon le germe, l'abondance et l'âge de la culture de 3 à 5 p. 1.000. Pour les cultures jeunes et pas trop abondantes, on peut se contenter d'un formolage à 2,5 p. 1.000; encore les résultats de l'opération doivent-ils, dans ce cas, être contrôlés soigneusement, tant par l'ensemencement en milieux nutritifs que par des inoculations d'épreuve aux animaux. Cette proportion de formol, indispensable pour assurer la stérilisation des toxines centrifugées ou des cultures totales, est vraisemblablement trop forte lorsqu'il s'agit de toxines aussi peu constantes et faibles comme celles du *B. histolytique* ou du *Vibrio septique*, que l'on ne saurait comparer, comme fonction toxique, ni à la toxine diphtérique, ni à la toxine tétanique (1).

(1) Cette hypothèse paraît d'autant plus vraisemblable que la toxine du *B. aëdematiens*, dont la fonction toxique est beaucoup plus accusée et plus constante, résiste infiniment mieux à l'action du formol; le taux antitoxique des sérums anti-*aëdematiens* n'a effectivement pas ou peu varié depuis l'utilisation des toxines formolées.

Les divers essais que nous avons effectués (réduction du taux de formol, maintien plus ou moins prolongé à l'étuve) pour atténuer la quasi-incompatibilité existant entre la conservation du pouvoir antigène de ces toxines faibles et complexes et le taux nécessaire de formol pour détruire les spores de tels germes, ne nous ont pas donné de résultats appréciables. C'est pourquoi il nous paraît plus logique de continuer la préparation des sérum fortament anti-Vibron septique et anti-histolytique d'abord par l'emploi d'antigènes formolés, puis par la toxine centrifugée de la culture vivante.

III. — Comparaison des résultats obtenus par les divers procédés d'immunisation essayés, avec les antigènes formolés.

Nous avons exposé précédemment avec quelques détails les résultats des titrages des 38 sérum obtenus en soumettant les chevaux à divers procédés d'immunisation ayant pour but, tout en conservant les antigènes formolés, d'obtenir de meilleurs sérum en renforçant la réaction organique locale ou générale des animaux en préparation.

Ces diverses techniques, modifiées légèrement par addition à la toxine centrifugée formolée utilisée ordinairement soit de substances aspécifiques (tapioca, sang), soit de protéines spécifiques (corps microbiens formolés, anacultures) ont été appliquées à toutes les immunisations mensuelles effectuées de Novembre 1927 au mois de Mars 1928.

La comparaison des titrages, dont nous avons donné antérieurement le détail avec la moyenne des titrages que nous avions faits au début de l'année 1927 (jusqu'en Novembre exclusivement) nous permet d'apprécier aujourd'hui les avantages obtenus par ces diverses modifications de technique.

Nous n'entrerons pas dans le détail des observations que nous avons relevées, car de l'ensemble de nos constatations ne se dégage aucun résultat très nettement positif.

1^o Les titrages effectués après Mars 1928 ne sont pas très sensiblement supérieurs, en valeur, à ceux effectués sur les mêmes chevaux, antérieurement au mois de Novembre 1927.

2° Les différences constatées en faveur des sérum obtenus par les techniques modifiées que nous indiquions ci-dessus sont d'un ordre tel que leurs oscillations ne dépassent pas en intensité celles que l'on peut observer, avec une même technique, d'un cheval à l'autre, et résultant simplement de l'aptitude individuelle de l'animal à produire plus ou moins facilement des anticorps.

3° Dans ces conditions, il suffit de déterminer si les quelques améliorations légères obtenues justifient des modifications de technique qui offrent, par ailleurs, quelques inconvénients.

On ne saurait faire entrer en ligne de compte au nombre de ces inconvénients les quelques manipulations supplémentaires nécessaires pour incorporer à la toxine les diverses substances activantes de la réaction organique (tapioca, sang, corps microbiens formolés). Par contre, la proportion d'abcès consécutifs aux injections observés chez les animaux immunisés de Novembre 1927 à Mars 1928 par ces nouvelles techniques est très supérieure par rapport aux quelques accidents analogues qu'entraîne l'injection de toxine centrifugée formolée seule. D'autre part, si les abcédations sont plus fréquentes au point d'injection, la réaction locale, déjà fort accusée par l'emploi de la toxine centrifugée formolée toute seule ne gagne pas énormément en intensité par l'ajonction des diverses substances que nous avons essayées. L'addition de corps microbiens formolés, si elle n'ajoute rien en intensité à la réaction locale obtenue, entraîne par exemple une induration extrêmement durable du tissu conjonctif, laissant par la suite la peau très adhérente aux plans sous-jacents, ce qui est un obstacle parfois très gênant aux injections ultérieures.

Abcédations plus fréquentes et indurations étendues, d'une part, et ne correspondant pas, d'autre part, à une réaction locale sensiblement plus active, tels sont les motifs qui ne nous paraissent pas en faveur des modifications de technique que nous avions essayées.

La présence constante dans les toxines centrifugées formolées ordinaires, que nous utilisons de longue date, d'une proportion toujours assez grande d'éléments microbiens suffit à assurer une réaction locale suffisante pour assurer l'absorption de la toxine dans des conditions d'activité réactionnelle de

l'organisme très voisines de l'optimum. S'il est nécessaire d'accroître cette réaction, nous pensons plus utile d'augmenter la proportion de corps microbiens contenus dans cette toxine (soit par adjonction de microbes formolés, soit par emploi d'anacultures ou de cultures faiblement centrifugées). Encore ne faut-il pas dépasser, dans cette voie, la limite dont nous parlions à propos des microbes formolés et au delà de laquelle subsistent des indurations étendues, gênantes pour la suite de l'immunisation. L'addition de corps microbiens paraît susceptible d'ajouter à la réaction locale et générale, d'ordre aspéciifique, provoquée par une substance hétérologue, une action spécifique résultant des protéines très spéciales qui constituent le microbe lui-même.

Résumé.

De l'ensemble des expériences précédentes, ainsi que de l'examen des titrages périodiques effectués depuis le début de leur préparation sur les sérum antiganréneux monovalents (*anti-perfringens*, anti-Vibron septique, anti-histolytique, anti-*œdematiens*), on peut retenir les indications générales suivantes :

1. **POUVOIR ANTITOXIQUE.** — Les sérum à la fois *antitoxiques et antimicrobiens* présentent un pouvoir antitoxique très généralement supérieur (plus rarement équivalent) à celui des sérum préparés avec de la toxine filtrée (*sérum antitoxiques purs*). Les sérum exclusivement *antimicrobiens*, préparés avec des microbes formolés, jouissent souvent aussi de propriétés antitoxiques, parfois égales, mais le plus souvent inférieures à celles des sérum précédents.

2. **POUVOIR ANTI-INFECTIEUX.** — C'est également aux sérum à la fois antitoxiques et antimicrobiens que revient le pouvoir anti-infectieux le plus accusé. Les sérum purement antitoxiques sont aussi nettement anti-infectieux ; quant aux sérum exclusivement antimicrobiens, leur pouvoir anti-infectieux reste médiocre.

3. **Pouvoir agglutinant.** — Les sérum les plus nettement agglutinants sont évidemment les sérum antimicrobiens et mixtes (ces derniers à des taux parfois très élevés). Il est remarquable que bien qu'à un taux, en général bien inférieur, les sérum antitoxiques sont aussi agglutinants.

4. La dénomination de sérum *antitoxiques*, *antimicrobiens* ou *mixtes* (à la fois antitoxiques et antimicrobiens) s'applique donc beaucoup plus à leur mode de préparation qu'à leurs propriétés. Ces propriétés (antitoxiques, anti-infectieuses et agglutinantes) se retrouvent, dans tous les sérum, avec une prépondérance variable selon le procédé d'immunisation utilisé.

5. Le taux des anticorps des chevaux préparés exclusivement par injections de microbes formolés ne s'affirme nettement que lorsque leur immunisation est déjà assez poussée ; toute interruption ou ralentissement de cette immunisation amène une chute de ces anticorps.

6. L'utilisation d'antigènes formolés dans la préparation des sérum antigangrénous monovalents a entraîné peu à peu une diminution de leur pouvoir antitoxique, compensée par une légère augmentation de leur pouvoir anti-infectieux, pour les sérum anti-Vibrio septique et anti-histolytique.

Le sérum anti-*aedematiens* fait exception, du fait que la toxine *aedematiens*, beaucoup plus active et plus stable, conserve vraisemblablement mieux sa fonction antigène sous l'action du formol. Il en est de même du sérum anti-*perfringens*.

7. L'addition de substances diverses à la toxine centrifugée formolée, couramment utilisée pour l'immunisation des chevaux, a été essayée : substances aspécifiques (tapioca, sang) ou spécifiques (corps microbiens formolés, emploi d'anacultures).

Ces modifications de techniques peuvent améliorer légèrement, mais irrégulièrement, les sérum obtenus. Ces variations sont d'un ordre minime, toujours inférieur à celles que l'on peut observer d'un animal à l'autre du simple fait des sensibilités individuelles. Les avantages obtenus ne compensent pas,

dans la pratique, les quelques inconvénients résultant de ces modifications de techniques.

8. La réaction locale obtenue par injection sous-cutanée de la toxine centrifugée formolée des anaérobies de la gangrène gazeuse est par elle-même très accusée. S'il est nécessaire de la renforcer encore pour certains sujets, il est préférable d'y ajouter des corps microbiens formolés dont les protéines spécifiques augmentent aussi l'activité de sérum.

9. Le formol modifiant le pouvoir antigène de la toxine du Vibron septique et de celle du *B. histolytique*, il est préférable de commencer l'immunisation des chevaux contre ces microbes par l'injection d'antigènes formolés et de la terminer en utilisant la toxine centrifugée de cultures vivantes.

SUR L'ANTAGONISME MICROBIEN *IN VITRO*

par V. ZAVAGLI.

Le phénomène de l'antagonisme microbien *in vitro*, connu depuis longtemps, a toujours été l'objet de nombreuses recherches. Les différents expérimentateurs ont étudié principalement ce qui se passe lorsque des germes sont ensemencés dans des milieux nutritifs, où, une autre culture, soit du même germe, soit de microbes différents, s'est déjà développée.

En général, ils expérimentaient, avec des cultures liquides stérilisées, soit par la chaleur, soit par la filtration sur bougie.

Bien que les résultats de ces observations ne soient pas toujours concordants, une chose cependant est bien établie : l'impossibilité ou le ralentissement du développement, lorsque des microbes particuliers sont ensemencés dans un milieu où une précédente culture a été obtenue.

Différentes interprétations de ce phénomène ont été données. On considère, par exemple, qu'il est dû à la présence dans ce milieu de substances particulières (diastases, etc.) produites par le germe qui a poussé le premier.

D'autre part, Arnaudi Kopakzewschi (1) ont étudié si le développement d'un microbe, produit, dans le milieu de culture, des modifications d'ordre physico-chimique susceptibles d'expliquer l'apparition dans ce milieu, des manifestations antagonistes.

Ils ont observé, qu'en général, les milieux liquides subissent du fait du développement de germes, des changements manifestes dans leurs propriétés physico-chimiques (tension superficielle, concentration en ions H+, répartition des charges électriques, etc.). Ils supposent que ces variations doivent jouer un rôle important dans ce phénomène particulier.

(1) *C. R. Acad. des Sciences*, 1923, p. 1.336; 1927, p. 153.

Enfin, nous ne nous arrêterons pas à rappeler d'autres conceptions qui ont été aussi admises sans qu'on puisse d'ailleurs s'accorder sur une exacte interprétation de cette importante manifestation (1).

Parmi la série des germes qui ont des propriétés antagonistes, une place à part est réservée à un groupe spécial de microbes, qui sont antagonistes envers la Bactéridie; les plus étudiés sont le *B. Pyocyanique*, le *Typhique* et les *Parathyphiques*, le *Streptocoque*, le *Staphylocoque*, le *Pneumocoque*, le *B. Friedländer*, le *Vibrio cholérique*, le *B. Coli*, etc.

Nous avons cherché quel rôle exact joue, dans le phénomène de l'antagonisme microbien, la variation du *pH* que les germes provoquent dans le milieu de culture.

Nous avons d'abord examiné jusqu'à quel point un germe est capable de modifier le *pH* d'un bouillon normal dans lequel il se développe et, si le maximum de variation est le même pour chaque germe, ou si cette limite varie en ensemencant le même germe sur des milieux de culture à différents *pH*. Enfin nous avons filtré les cultures de différents microbes, établi les variations du *pH*, réajusté le *pH* jusqu'au degré normal, stérilisé par passage à travers des bougies et ensemencé le filtrat avec des germes déterminés.

Nos recherches ont particulièrement porté sur les antagonismes microbiens de *Bacillus anthracis* qui apparaissent comme les plus importants parmi la manifestation de ce curieux phénomène.

Dans nos recherches nous nous sommes servi de la technique suivante : nous avons ensemencé, sur des ballons de $\frac{1}{2}$ litre de bouillon-viande-peptone, les différents germes choisis presque tous parmi ceux qui sont connus comme antagonistes envers la bactéridie. Nous avons recherché tout d'abord quel était le nombre de jours de culture le plus favorable pour nos expériences. Les cultures avant d'être filtrées ont été contrôlées en ensemencant un tube de bouillon et un tube de gélose; puis elles ont été filtrées sur papier Laurent de façon à obtenir un liquide limpide qui permette une détermi-

(1) Pour la bibliographie complète, nous nous reportons à : PAPACOSTAS et GATÉ. *Les associations microbiennes. Leurs Applications Thérapeutiques.* (Edit. Doin et Cie Paris, 1928).

nation sûre du pH . Nous avons observé que les bougies, même lavées, peuvent facilement altérer les résultats en cette espèce. Puis nous avons ajusté le pH à différents degrés, dans nos liquides, répartis en plusieurs ballons. Nous avons ensuite filtré séparément chaque ballon sur bougie Chamberland L. Nous avons réparti le filtrat aseptiquement au moins en 6 tubes à essai pour chaque valeur de pH , et chaque fois nous avons déterminé de nouveau le pH réel du liquide filtré. Les séries de tubes ont été mises à l'étuve pendant vingt-quatre heures pour en contrôler la stérilité, puis ont été ensemencées avec des germes choisis de culture rapide, sur bouillon normal.

Les tubes ainsi ensemencés et mis à l'étuve ont été examinés dans les premières heures (trois, six heures) et ensuite à vingt-quatre et quarante-huit heures. Nous avons toujours complété l'examen extérieur de la culture par un contrôle microscopique des cultures fraîches et des frottis colorés. Pour les déterminations des pH nous avons utilisé la méthode colorimétrique de Sörensen et les résultats, pour les pH élevés, ont été contrôlés par la méthode électrométrique.

Nous avons grand plaisir à remercier ici M. Abt pour ses précieux conseils à ce sujet.

Sur chaque filtrat nous avons ensemencé d'abord le germe de la culture lui-même, puis *B. coli* que nous avons utilisé aussi comme indice du degré d'opacité des différents filtrats, enfin le charbon virulent et le deuxième vaccin anticharboneux au cas où il se serait montré moins résistant et plus facilement utilisable pour la mise en évidence des phénomènes d'antagonisme.

Ayant constaté que le *B. pyocyanique* par exemple, qu'il soit ensemencé sur bouillon, de pH 6, 7 ou 8, donne après dix jours, des milieux d'une égale réaction, nous avons toujours ensemencé nos germes dans des milieux de $pH = 7$ ou 7,2. Enfin nous nous sommes convaincu qu'un délai de culture de dix jours à 37° était suffisant pour nos expériences, exception faite pour le *B. pyocyanique* et le *B. coli*, pour lesquels nous avons jugé nécessaire d'expérimenter avec des cultures de vingt jours.

A côté des ballons ensemencés nous avons mis des tubes avec du bouillon stérile, pour observer si, par le séjour à

l'étude se pouvaient produire naturellement des variations dans le *pH*. Mais nous n'avons pas constaté des variations dans le *pH* dans ce milieu de contrôle.

Nous avons essayé 10 microbes, comme le montrent les tableaux suivants (1).

TABLEAU I. — *B. Friedländer*.

Ensemencé le 18 mars en bouillon. *pH* = 7,2
Filtrat obtenu le 28 mars *pH* = 7,6
Le *pH* est ajusté aux valeurs de 7-6, 5-6.

	<i>pH</i> = 7,6	<i>pH</i> = 7	<i>pH</i> = 6,5	<i>pH</i> = 6	BOUILLON contrôle
Filtrat + Friedländer . . .	+	+	+	+	X
Filtrat + <i>B. Coli</i>	X	X	X	X	X
Filtrat + <i>B. Anthracis</i> . . .	+	X	+	-	X
Filtrat + premier vaccin . . .	+	+	+	-	X

TABLEAU II. — *Streptococcus normand*.

Ensemencé le 20 mars en bouillon. *pH* = 7,2
Filtrat obtenu le 30 mars *pH* = 8,0
Le *pH* est ajusté aux valeurs de 7-6,5.

	<i>pH</i> = 8	<i>pH</i> = 7	<i>pH</i> = 6,5	BOUILLON contrôle
Filtrat + <i>Streptococcus normand</i> . . .	+	+	+	X
Filtrat + <i>B. Coli</i>	X	X	+	X
Filtrat + <i>Anthracis virulent</i>	+	X	+	X
Filtrat + deuxième vaccin	+	+	+	X

TABLEAU III. — *Typhose aviaire*.

Ensemencé le 2 avril en bouillon. *pH* = 7,0
Filtrat obtenu le 12 avril *pH* = 8,0
Le pli est ajusté aux valeurs de 7-6,5-6.

	<i>pH</i> = 8	<i>pH</i> = 7	<i>pH</i> = 6,5	<i>pH</i> = 6	BOUILLON contrôle
Filtrat + Typhose aviaire . . .	+	+	+	+	X
Filtrat + <i>B. Coli</i>	+	X	X	+	X
Filtrat + <i>B. Anthracis virulent</i> . . .	+	X	+	-	X
Filtrat + deuxième vaccin	+	+	+	-	X

(1) —, pas de culture; X, culture normale.

TABLEAU IV. — *Staphylococcus doré*.

Ensemencé le 2 avril en bouillon. pH = 7,2
 Filtrat obtenu le 12 avril pH = 8,62

Le pH est ajusté aux valeurs de 7-6.

	pH = 8,62	pH = 7	pH = 6,0	BOUILLON contrôle
Filtrat + <i>Staphylococcus doré</i>	—	+	—	×
Filtrat + <i>B. Coli</i>	+	×	—	XX
Filtrat + <i>Anthraxis virulent</i>	+	+	—	XX
Filtrat + deuxième vaccin	+	+	—	XX

TABLEAU V. — *Paratyphique A*.

Ensemencé le 14 avril en bouillon. pH = 7,2
 Filtrat obtenu le 24 avril. pH = 8,8

Le pH est ajusté aux valeurs de 8-7-6.

	pH = 8,8	pH = 8	pH = 7	pH = 6	BOUILLON contrôle
Filtrat + <i>Paratyphique A</i>	+	+	×	—	XX
Filtrat + <i>B. Coli</i>	+	×	XX	—	XX
Filtrat + <i>B. Anthracis virulent</i>	+	+	XX	—	XX
Filtrat + deuxième vaccin.	—	+	+	—	XX

Dans le filtrat non modifié pH = 8,8 le *B. Anthracis* était agglutiné et déformé. Idem pour le deuxième vaccin dans le bouillon pH = 8.

TABLEAU VI. — *B. typhique*.

Ensemencé le 4 avril en bouillon pH = 7,0
 Filtrat obtenu le 14 avril. pH = 8,8

Le pH est ajusté aux valeurs de 7,5-6,5-6.

	pH = 8,8	pH = 7,6	pH = 6,5	pH = 6	BOUILLON contrôle
Filtrat + <i>B. typhique</i>	+	×	×	+	XX
Filtrat + <i>B. Coli</i>	+	×	XX	+	XX
Filtrat + <i>B. Anthracis virulent</i>	+	×	XX	+	XX
Filtrat + deuxième vaccin.	+	+	+	—	XX

Le *B. Anthracis* dans le bouillon de pH = 8,8 est agglutiné et altéré.

TABLEAU VII. — **Paratyphique B.**

Ensemencé le 24 avril en bouillon pH = 7,2
 Filtrat obtenu le 4 mai pH = 9

Le pH est ajusté aux valeurs de 8-7-6,5.

	pH = 9	pH = 8	pH = 7	pH = 6	BOUILLON contrôle
Filtrat + Paratyphique B	+	+	×	×	×
Filtrat + <i>B. Coli</i>	+	+	×	×	XX
Filtrat + <i>B. Anthracis virulent</i>	+	+	×	×	XX
Filtrat + deuxième vaccin	-	+	+	+	XX

Le *B. Anthracis* dans le bouillon de pH = 9 et 8 est agglutiné et altéré. Idem pour le deuxième vaccin dans le bouillon pH = 8.

TABLEAU VIII. — ***B. pyocyanique*.**

Ensemencé le 2 mai en bouillon pH = 7,2
 Filtrat obtenu le 22 mai pH = 9,0

Le pH est ajusté aux valeurs de 7-6,8.

	pH = 9	pH = 7	pH = 6,8	BOUILLON contrôle
Filtrat + <i>B. pyocyanique</i>	-	×	×	XX
Filtrat + <i>B. Coli</i>	-	+	+	XX
Filtrat + <i>B. Anthracis virulent</i>	-	+	+	XX
Filtrat + deuxième vaccin	-	+	+	XX

TABLEAU IX. — ***B. Coli*.**

Ensemencé le 2 mai en bouillon pH = 7,0
 Filtrat obtenu le 22 mai pH = 9,61

Le pH est ajusté aux valeurs de 7-6,5.

	pH = 9,61	pH = 7	pH = 6,5	BOUILLON contrôle
Filtrat + <i>B. Coli</i>	-	+	+	XX
Filtrat + <i>B. Faecalis Alcaligenes</i>	-	+	+	XX
Filtrat + <i>B. Anthracis virulent</i>	-	+	+	XX
Filtrat + deuxième vaccin	-	+	+	XX

TABLEAU X. — *B. Faecalis Alcaligenes*.

ensemencé le 10 avril en bouillon pH = 7,0
 Filtrat obtenu le 20 avril pH = 9,12

Le pH est ajusté aux valeurs de 7,2-6,7-6.

	pH = 9,12	pH = 7,2	pH = 6,7	pH = 6	BOUILLON contrôle
Filtrat + <i>B. Faecalis Alcaligenes</i>	+	X	X	+	XX
Filtrat + <i>B. Coli</i>	—	++	++	—	XX
Filtrat + <i>Anthracis virulent</i>	—	+	+	—	
Filtrat + deuxième vaccin.	—	+	+	—	

Nous avons disposé nos tableaux en rapport avec le pouvoir de développement de *B. anthracis* sur les différents filtrats. On observera tout d'abord que le développement de la bactéridie dans les différents filtrats est inversement proportionnel aux variations de pH imprimées au milieu par les germes au terme de la première culture. Le même phénomène s'observe, bien que moins régulièrement pour les différents germes ensemençés dans leurs filtrats homologues ou respectifs. Les variations de pH que nous avons observées, varient d'un minimum de 0,4 (pH 7,2 à pH 7,6) pour le *B. de Friedländer*, jusqu'à 2°61 (pH 7, à pH 9,61) pour le *B. coli*.

Ce que nous venons d'exposer démontre que le pouvoir empêchant, en général, que les germes que nous avons expérimentés ont montré, soit envers eux-mêmes, soit envers d'autres bactéries, est fonction de la variation du pH. Cette première observation semble devoir être aussitôt confirmée par cette autre, que si nous reportons progressivement les filtrats à leurs pH normaux les phénomènes d'antagonisme perdent beaucoup de leur netteté. En effet, les filtrats de la culture de tous les germes essayés ont montré des changements évidents dans leur propriété antagoniste, lorsque le liquide reprend ces caractères de pH normaux. De plus, si nous changeons encore la réaction des milieux, l'antagonisme réapparaît.

Mais il faut remarquer que ces variations du pH sont bien

loin d'avoir fait disparaître complètement la manifestation de l'antagonisme.

Nous sommes cependant autorisé à affirmer que ce phénomène représente un des éléments principaux dans la production des apparences de l'antagonisme microbien.

Ensuite nos essais ont montré cet autre fait, que les germes qui apparaissent les moins empêchants envers les autres sont, en général, ceux qui entraînent une moindre destruction de substances nutritives du milieu de culture.

En effet, de toute évidence, l'épuisement du milieu est un autre facteur des manifestations de l'antagonisme microbien. Ce fait est admis par beaucoup d'auteurs. Il a été aussi démontré par Berdnikow (1) qui a vu le pouvoir antagoniste d'un filtrat disparaître dans quelques expériences par addition de bouillon normal à la culture. Ce point de vue est consolidé encore dans nos expériences. En effet nous avons noté que pour arriver à produire un antagonisme manifeste, entre *B. anthracis*, *B. pyocyanique* et *B. coli*, il a fallu prolonger la période du développement de la culture jusqu'à vingt jours c'est-à-dire jusqu'à un épuisement très avancé du milieu. L'épuisement du milieu était tel que le pyocyanique même, le *B. coli*, et autres germes très faciles à cultiver n'ont pu se multiplier dans ces bouillons. D'autre part nous avons aussi expérimenté en ajoutant du bouillon normal et aussi de la poudre d'œuf, en réalisant de cette façon une diminution marquée du pouvoir antagoniste. Dans quelques autres cas, nous avons utilisé en même temps que le relèvement du pouvoir nutritif du milieu, le réajustement de son pH. C'est alors que nous sommes arrivé à faire presque complètement disparaître le phénomène d'antagonisme.

Un fait qui doit être mis bien en évidence c'est que *B. fæcalis alcaligenes* a montré envers la bactéridie une action empêchante supérieure à celle de tous les autres germes que nous avons étudiés. Ce fait vient confirmer ce que Sanarelli affirme, c'est à-dire que plusieurs germes, hôtes normaux habituels de l'intestin, exercent en général une action empêchante envers la bactéridie. C'est un argument de plus en faveur de la théorie

(1) BERDNIKOW : *C. R. Soc. biol.*, 1924, p. 589 et 1.304.

qui considère la voie intestinale comme peu favorable à l'invasion de l'organisme par *B. anthracis*. En effet Sanarelli affirme en outre que si les spores du charbon peuvent aussi trouver dans l'intestin des conditions favorables à leur développement, elles ne peuvent pas devenir dangereuses pour l'organisme, en raison de l'action du *B. coli* qui empêche presque complètement leur développement. Si les choses se passent en réalité

TABLEAU XI.

Ensemencé le 2 avril en bouillon pH = 7,0
Filtrat obtenu le 22 avril pH = 9,0

Le pH est ajusté aux valeurs de 8,4-8-7,5-7-6.

	pH = 9	pH = 8,4	pH = 8	pH = 7,5	pH = 7	pH = 6	BOUILLON contrôle
Filtrat + <i>B. pyocyanique</i>	-	+	+	X	X	-	X
Filtrat + bouillon + <i>B. pyocyanique</i>	+	+	X	X	X	+	X
Filtrat + <i>B. Coli</i>	-	+	+	+	+	+	X
Filtrat + bouillon + <i>B. Coli</i>	+	+	+	X	X	+	X
Filtrat + <i>B. Anthracis virulent</i>	-	+	+	+	+	+	X
Filtrat + bouillon + <i>B. Anthracis virulent</i>	-	+	+	+	+	+	X
Filtrat + poudre d'oeuf en quantité variable + <i>B. Anthracis virulent</i>	+	X	X	X	X	+	X

ainsi, ce fait apparaîtra d'autant plus évident maintenant que nous avons vu qu'un autre germe, hôte habituel de l'intestin (*B. faecalis alcaligenes*), peut produire *in vitro* une action empêchante plus marquée encore que celle du *B. coli*. Mais, si l'épuisement du milieu et l'altération du pH sont les facteurs les plus importants des manifestations d'antagonisme, ce ne sont pas les seules à le produire. En effet, reportant les conditions au degré normal, nous n'avons pas pu faire disparaître complètement dans tous les cas l'antagonisme, de façon à obtenir une culture parfaitement égale à celle développée dans le bouillon contrôle. Les autres facteurs aussi jouent leur rôle dans la production du phénomène. Ils sont probablement d'ordre physico-chimique. Si des expériences pouvaient démontrer que réellement les changements de la viscosité du milieu, de la

conductibilité électrique etc., produits dans les milieux par la première culture ont une action manifeste dans la production de l'antagonisme, nos connaissances sur cette question seraient presque complètes (1).

(*Laboratoire National de Recherches, Alfort*).

(1) A M. le professeur H. Vallée qui nous a indiqué cet argument et qui nous a toujours guidé et conseillé dans nos expériences nous exprimons ici nos sentiments les plus reconnaissants.

Le Gérant : G. MASSON.

Annales de l' Institut Pasteur
TOME XLIII.
(PL. III)

Fig. 1

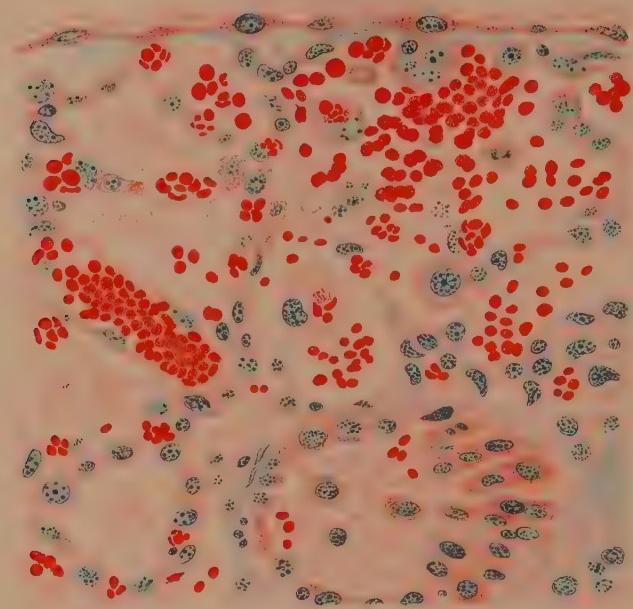
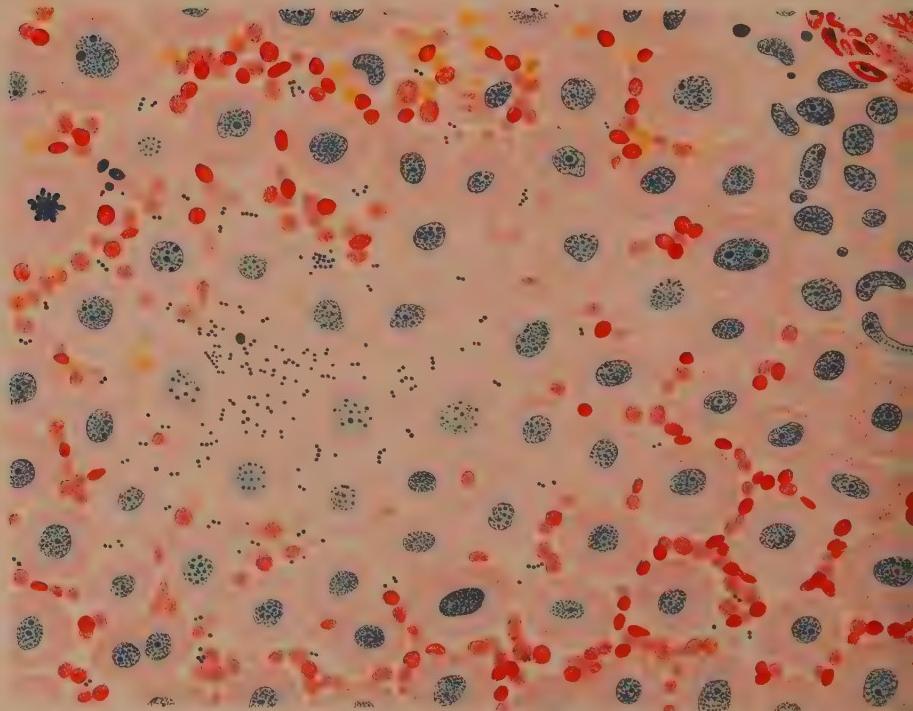


Fig. 2



SANARELLI-PERGHER. Spirochétoses ictérogènes.
2^{me} Mémoire ; PL. I.

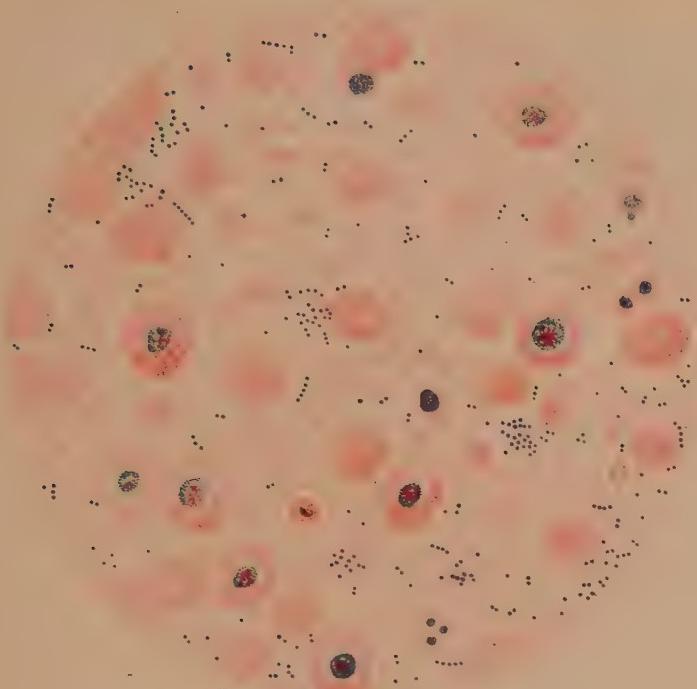


Fig. 3

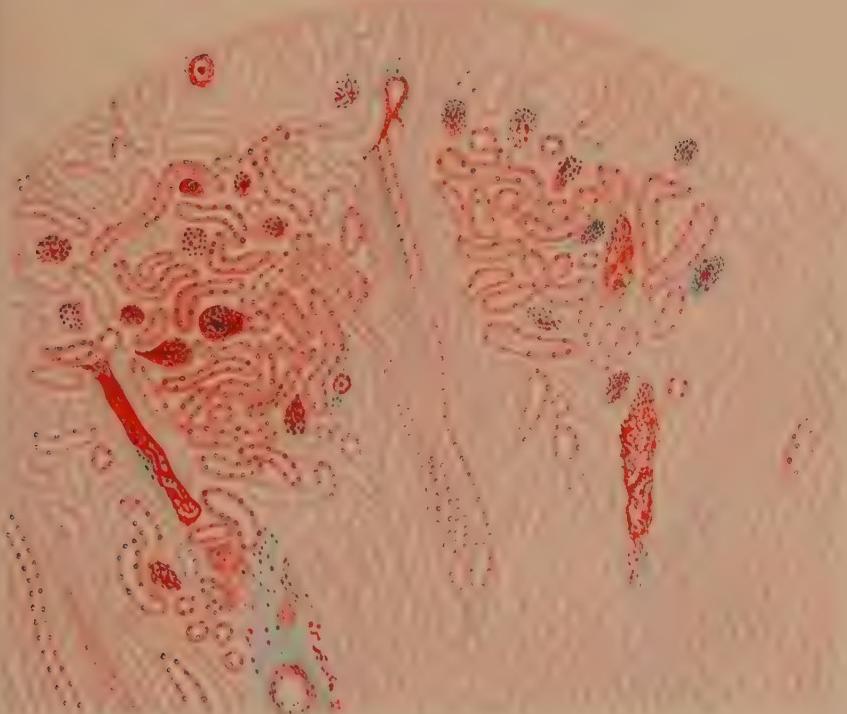


Fig. 4

Fig. 5

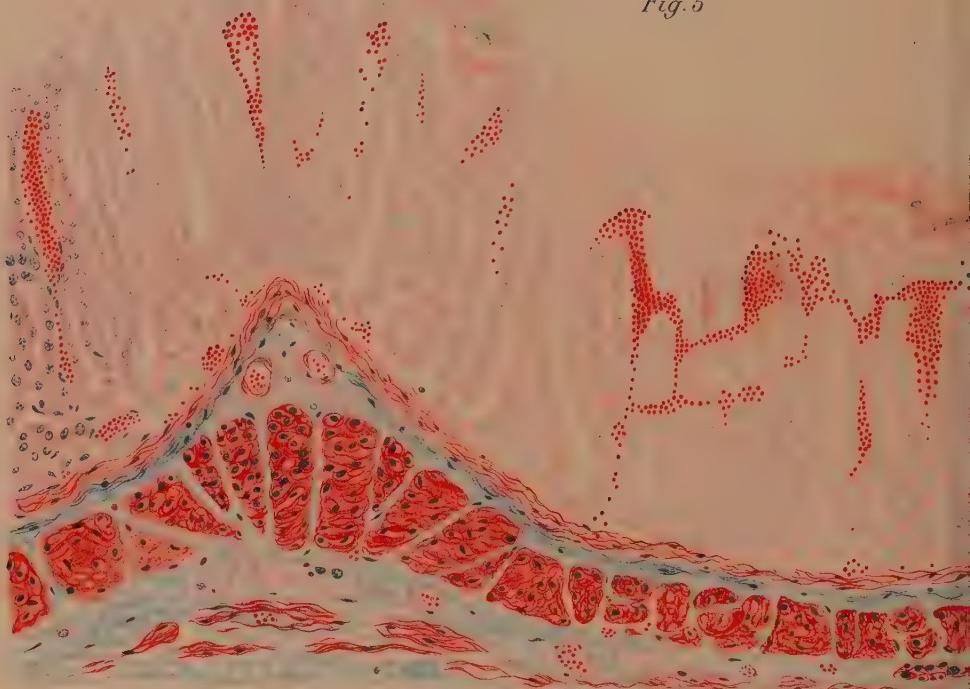


Fig. 6



SANARELLI-PERGHER. Spirochétoses ictérogènes.
2me Mémoire ; PL. II.



Fig. 7



Fig. 8

ULYSSE GAYON

1845 - 1929

Nous avons le regret de faire part aux lecteurs de ces Annales du décès du plus ancien des élèves directs de Pasteur, le professeur Ulysse Gayon.

A sa sortie de l'Ecole Normale Supérieure, Gayon était entré au Laboratoire de Pasteur en qualité d'agrégé préparateur. Il y fit sa thèse de doctorat ès sciences sur les altérations microbiennes des œufs, puis il fut nommé à la Faculté des Sciences de Bordeaux où il enseigna la Chimie et dirigea pendant de longues années la Station Agronomique. Les travaux de Gayon sur la fermentation des fumiers, sur les microbes dénitritifiants, sur la fermentation mannitique et les maladies des vins sont classiques. En collaboration avec le professeur Millardet, il montra l'action des sels de cuivre sur les spores du mildiou et vulgarisa l'emploi de la bouillie bordelaise dans la lutte contre ce champignon.

La vie de Gayon fut tout entière consacrée à la science et à ses applications à l'agriculture. Il était le conseiller des viticulteurs de la région bordelaise. Son autorité tenait à l'importance de ses travaux, à son désintéressement et aussi à la droiture et à l'affabilité de son caractère.

Gayon était doyen honoraire de la Faculté des Sciences de Bordeaux, Correspondant de l'Académie des Sciences et Membre associé de l'Académie d'Agriculture.

Il s'est éteint le 11 avril à l'âge de 83 ans.

